



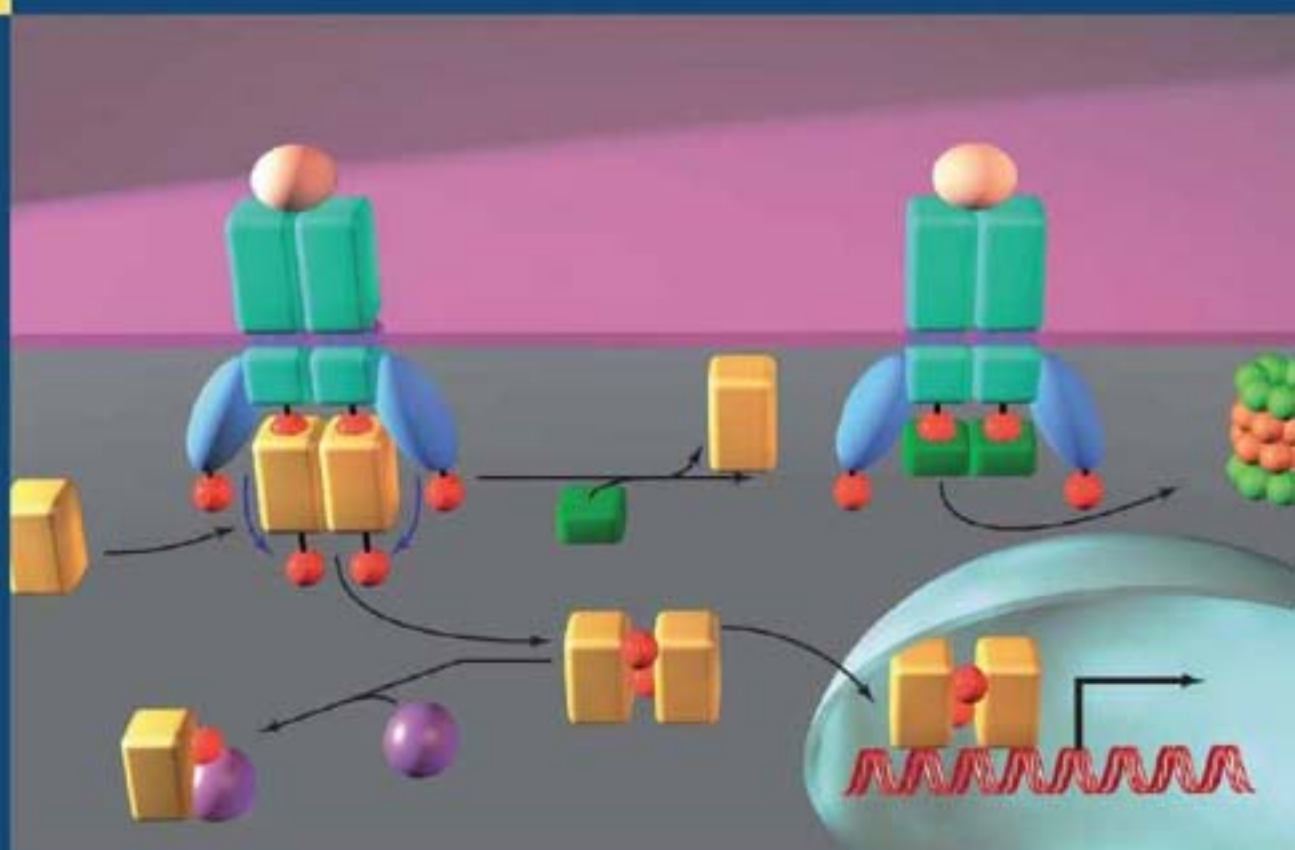
COLLECTION ONCOLOGIE PRATIQUE

Dirigée par Jean-François Morère

Jacques Robert

Signalisation cellulaire et cancer

Un manuel pour les étudiants et les oncologues



 Springer

Signalisation cellulaire et cancer

Springer

Paris

Berlin

Heidelberg

New York

Hong Kong

Londres

Milan

Tokyo

Jacques Robert

Signalisation cellulaire et cancer

Un manuel pour les étudiants et les oncologues



Springer

Jacques Robert

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Institut Bergonié

229, Cours de l'Argonne

33076 Bordeaux Cedex

Additional material to this book can be downloaded from <http://extras.springer.com>.

ISBN-13 : 978-2-8178-0027-1 Springer paris Berlin Heidelberg New-York

© Springer-Verlag France, Paris, 2010
Imprimé en France

Springer-Verlag France est membre du groupe Springer Science + Business Media

Cet ouvrage est soumis au copyright. Tous droits réservés, notamment la reproduction et la représentation la traduction, la réimpression, l'exposé, la reproduction des illustrations et des tableaux, la transmission par voie d'enregistrement sonore ou visuel, la reproduction par microfilm ou tout autre moyen ainsi que la conservation des banques de données. La loi française sur le copyright du 9 septembre 1965 dans la version en vigueur n'autorise une reproduction intégrale ou partielle que dans certains cas, et en principe moyennant le paiement des droits. Toute représentation, reproduction, contrefaçon ou conservation dans une banque de données par quelque procédé que ce soit est sanctionnée par la loi pénale sur le copyright.

L'utilisation dans cet ouvrage de désignations, dénominations commerciales, marques de fabrique, etc. même sans spécification ne signifie pas que ces termes soient libres de la législation sur les marques de fabrique et la protection des marques et qu'ils puissent être utilisés par chacun.

La maison d'édition décline toute responsabilité quant à l'exactitude des indications de dosage et des modes d'emplois. Dans chaque cas il incombe à l'utilisateur de vérifier les informations données par comparaison à la littérature existante.

Maquette de couverture : Nadia Ouddane

Mise en page : Graficoul'Eure

Illustration de couverture : © Marc Donon



Préface

L'étude moléculaire du cancer, qui s'est développée de manière active au début des années 1970, quelque temps après les connaissances majeures acquises sur les mécanismes de la régulation des gènes chez les bactéries, a connu une ascension vertigineuse. Quarante ans de « recherche » qui s'est nourrie de la biodiversité des organismes vivants pour mettre à jour l'unicité du fonctionnement de la cellule, son extrême complexité, ses facultés uniques d'adaptation, mais aussi sa fragilité. La quête obsessionnelle des chercheurs pour percer les mécanismes de cancérisation de la cellule a eu le grand bénéfice de dévoiler la *biologie cellulaire* dans toute sa complexité, mais également son éclatante beauté. Si pour l'étudiant de biologie ou pour le jeune oncologue c'est la complexité qui éclate, je peux garantir qu'une connaissance plus approfondie des mécanismes intimes de la cellule révélera une extrême beauté dans les multiples mécanismes de communications, de rétro-contrôles, de réparation ainsi que dans la sophistication fonctionnelle des « machines cellulaires ».

Voici un bel ouvrage *Signalisation cellulaire et cancer*, écrit par le professeur oncologue et pharmacologue Jacques Robert dans une langue française bien maîtrisée. Ce livre décline la signalisation cellulaire de la cellule et ses altérations dans l'émergence des cancers en dix-huit chapitres avec une écriture directe, élaguée et hautement illustrée par des schémas éclairants et didactiques. Le lecteur pourra naviguer dans chaque chapitre entre les connaissances actualisées de la cascade de signalisation particulière, son implication en oncogenèse, et ses cibles pharmacologiques exploitées en clinique ou potentielles. L'ouvrage est astucieusement complété par trois annexes d'un grand intérêt oncologique couvrant respectivement: i) la réplication et la réparation de l'ADN; ii) le contrôle transcriptionnel; et iii) les processus de synthèse, de conformation, de modification covalente et d'activité des protéines.

Ce livre trouvera son utilité auprès de tous les étudiants de sciences, de médecine, de pharmacie ainsi qu'auprès des nombreux enseignants de disciplines diverses recouvrant en partie ou en totalité un fort intérêt pour la biologie du cancer et/ou son traitement.

Bravo à notre collègue Jacques Robert pour ce remarquable opus de cancérologie!

Jacques Pouységur
Directeur de recherche au CNRS
Membre de l'Académie des sciences

Remerciements

Je souhaite dédier cet ouvrage aux enseignants de cancérologie qui m'ont accueilli parmi eux avec confiance et générosité il y a vingt ans. J'ai eu le plaisir de travailler avec nombre d'entre eux dans bien des circonstances : enseignement, formations diverses, recherche, soins, congrès, sociétés savantes, comités éditoriaux, séminaires, collège professionnel, commissions de recrutement et d'évaluation. J'espère que ce livre pourra leur être utile dans l'exercice de leur métier. Je tiens à remercier tout particulièrement François Eschwège, Michel Marty et Maurice Schneider, qui m'ont chaleureusement ouvert les portes de la cancérologie et dont l'amitié m'est précieuse. Je leur offre ce petit ouvrage en témoignage de ma reconnaissance.

Un certain nombre de collègues et d'amis ont eu la gentillesse de relire certaines parties de l'ouvrage, et je tiens à les remercier de leurs encouragements d'une part, de leurs corrections et suggestions d'autre part : Jacques Bonnet, Abdelkader Bounaama, Patricia de Cremoux, Pierre Hubert, François Ichas, Florence Larminat, Valérie Le Morvan. S'il reste des erreurs et des imprécisions, j'en suis le seul responsable ! Je suis reconnaissant aux membres de mon équipe de recherche d'avoir toléré généreusement que je consacre quelques mois à cette rédaction qui m'a éloigné de leurs travaux. Mais je n'ose pas dire : « Je ne le ferai plus... »

Le point de départ de ce livre, ce sont les cours que je dispense depuis quelques années dans le cadre d'enseignement de mastères à l'université de Bordeaux-II, et les étudiants reconnaîtront nombre de schémas dessinés d'abord à leur intention. Je voudrais que les étudiants, qu'ils soient d'origine médicale, pharmaceutique ou scientifique, sachent que je prends toujours beaucoup de plaisir à enseigner et que mon ambition est qu'ils trouvent le plus vif intérêt à l'étude des cancers, qui représente l'un des plus grands défis soumis à la biologie comme à la médecine en ce début de siècle.

Certaines des figures que j'ai dessinées ont déjà été utilisées pour illustrer des revues parues dans le *Bulletin du Cancer* ou dans des ouvrages sur la thérapie ciblée des cancers. Je tiens à remercier les éditions John Libbey Eurotext, et plus particulièrement Valérie Parocco, d'avoir accepté que j'en utilise le dessin général pour cet ouvrage.

Ce dernier n'aurait pas vu le jour sans l'insistance du directeur de la collection, le Pr Jean-François Morère, la diligence de l'éditrice, Nathalie L'Horsset-Poulain, la vigilance de la responsable de fabrication, Sophie Guillemot, et la patience de l'illustrateur, Marc Donon : qu'ils en soient tous vivement remerciés !

SOMMAIRE

Préface	5
<i>J. Pouysségur</i>	
Remerciements	7
Avant-propos	11
Introduction	
Principes généraux de la signalisation cellulaire	15
Chapitre 1	
Les facteurs de croissance et les récepteurs à activité tyrosine kinase	21
Chapitre 2	
La voie des MAP kinases	45
Chapitre 3	
La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase	59
Chapitre 4	
La voie des cytokines	71
Chapitre 5	
La voie du TGFβ	83
Chapitre 6	
Les voies des récepteurs couplés aux protéines G	91
Chapitre 7	
La voie Wnt	103
Chapitre 8	
La voie Notch	111
Chapitre 9	
La voie Hedgehog	119
Chapitre 10	
La voie des sémaphorines	127
Chapitre 11	
La voie des intégrines	133

Chapitre 12	
Les récepteurs <i>toll-like</i>, l'interleukine 1 et le NFκB	145
Chapitre 13	
Les voies des récepteurs lymphocytaires	155
Chapitre 14	
Les voies des récepteurs nucléaires	163
Chapitre 15	
Récepteurs couplés à des canaux ioniques	177
Chapitre 16	
Signalisation par l'oxygène et l'oxyde nitrique	189
Chapitre 17	
Les voies de contrôle du cycle cellulaire	199
Chapitre 18	
Les voies de contrôle de l'apoptose	215
Annexe A	
Le contrôle de la réplication et de la réparation de l'ADN	235
Annexe B	
Le contrôle de l'expression des gènes	263
Annexe C	
Le contrôle de l'activité des protéines	283
Liste alphabétique des sigles, abréviations et acronymes	315

Avant-propos

Il semble qu'il y ait *a priori* antinomie entre le titre de l'ouvrage et celui de la collection. Publier un ouvrage *Signalisation cellulaire et cancer* dans une collection dédiée à la cancérologie pratique tient de la gageure : pour leur pratique, les cancérologues ont certes besoin de connaître les cancers, leurs formes cliniques, les outils de diagnostic et de traitement ; en quoi ont-ils besoin de connaître la biologie cellulaire ou moléculaire et les mécanismes à la base de l'oncogenèse ?

Et pourtant la réponse est positive : oui, ils ont besoin, pour leur pratique du ^{XXI}^e siècle, de connaître les systèmes de messagerie intercellulaire, de comprendre leurs interactions, leur rôle dans la prolifération cellulaire, leur implication dans les cancers. L'oncologie clinique est devenue dépendante de la connaissance de la biologie des cancers. Ne pas savoir que KRAS est en aval de l'EGFR dans une des voies majeures de signalisation condamnerait le praticien à prescrire des traitements inutiles, coûteux et parfois toxiques à près de la moitié des patients souffrant de cancers colorectaux métastatiques.

Nous avons voulu dans cet ouvrage garder l'esprit de la cancérologie pratique tout en fournissant les bases scientifiques de la compréhension des voies de signalisation. Nous n'avons certes pas voulu esquiver la complexité de ces voies, de leurs interactions, de leurs interconnexions : mais il n'est pas nécessaire d'être confus pour être exact, et la simplification est à la base de tout enseignement. Ne pas noyer le lecteur dans des détails et des cheminements tortueux a été un souci constant lors de la rédaction de cet ouvrage ; conserver les faits exacts et prouvés, montrer leur intérêt dans la pratique de l'oncologie clinique, fournir des schémas didactiques ont été notre préoccupation permanente.

En une vingtaine de chapitres apparemment indépendants, les principales voies de signalisation sont présentées, en donnant au mot « signalisation » une acception assez large. Nous n'avons pas limité notre propos aux messages arrivant à une cellule et à la transduction de l'information reçue ; nous avons étendu l'ouvrage à bien des voies de transmission d'information à l'intérieur d'une cellule, donnant au terme de « signalisation » le sens du mot anglais « pathway » qui décrit mieux ces systèmes de transmission d'information. Nous avons limité le support biochimique sans l'esquiver, et le lecteur trouvera en annexe la description de quelques mécanismes géné-

raux de régulation biologique, au niveau du contrôle de l'intégrité du génome, de l'expression des gènes et de l'activité des protéines.

Chaque chapitre essaie donc de se suffire à lui-même ; mais les interconnexions (*crosstalks*) sont telles que les renvois d'un chapitre à l'autre sont nombreux. Après la présentation des acteurs vient la description du cheminement de l'information dans la voie de signalisation, puis celle des régulations annexes. Nous avons dessiné chaque schéma en essayant de nous tenir à des conventions communes de couleur et de forme tout au long de l'ouvrage. Nous avons privilégié la lisibilité de ces schémas au détriment de leur exhaustivité ; les grands posters que chacun connaît, qui ressemblent au plan du métro de Paris, n'ont d'autre but que celui de montrer la complexité, mais certes pas celui d'apporter une information utilisable.

Chaque chapitre est complété par une brève liste des altérations oncogéniques de la voie décrite et par un bref inventaire des cibles pharmacologiques qui permettent ou permettront un jour un développement pharmacologique. Nous ne sommes pas entrés, pour ce dernier aspect, dans le détail des molécules actives, de leur utilisation éventuelle en clinique, de leur statut dans les diverses phases du développement : d'abord parce que les choses vont très vite et que ces données seraient périmées dès la publication de l'ouvrage, ensuite parce qu'elles sont accessibles dans bien d'autres sources d'information.

Nous avons limité les références bibliographiques à des revues générales accessibles sur la voie de signalisation décrite. Le lecteur désireux d'approfondir un point se tournera d'abord vers ces revues avant d'aller rechercher les articles originaux qui ont permis le développement des connaissances. Encore faut-il qu'il puisse les trouver dans le corpus des journaux disponibles *online* dans toutes les bibliothèques hospitalières et universitaires. Nous avons éliminé sans pitié d'excellentes revues de diffusion confidentielle : une référence est faite pour servir, non pour étaler ses lectures... Sur tout, nous n'avons pas cherché à référencer chaque assertion ou chaque description en la renvoyant à une référence précise : c'est impossible à réaliser dans un ouvrage qui se veut pratique, qui n'est pas et ne peut pas être, en 300 pages, une revue sur le sujet, mais un ouvrage didactique. L'appel « *Cell signaling AND cancer* » sur PubMed fait apparaître plus de 67 000 articles dont 15 000 revues. De toute façon, la banalisation de PubMed a rendu le travail bibliographique complètement différent de ce qu'il était il y a vingt ans. Nous en donnerons un seul exemple : il est mentionné page 33 : « Une translocation t(8;9)(p11;q33) du gène *FGFR1* est responsable d'une dimérisation spontanée du récepteur dans les syndromes myéloprolifératifs. » Il aurait été nécessaire autrefois de mentionner la source de cette assertion pour que le lecteur intéressé la retrouve ; il lui suffira de taper sur son ordinateur connecté « translocation t(8;9)(p11;q33) » pour voir apparaître six articles auxquels il peut immédiatement se référer ; il n'est pas nécessaire d'en mentionner un seul dans cet ouvrage.

Il existe plusieurs modalités de présentation de la signalisation cellulaire en cancérologie. On peut partir de la présentation successive des différents acteurs que l'on retrouve dans de multiples voies : signaux, récepteurs, protéines kinases, petites protéines G, facteurs de transcription, calcium, pour décrire leurs fonctions multiples. On peut encore choisir un niveau d'intégration « horizontal », topologique : la

membrane, le cytoplasme, la mitochondrie, le noyau. Nous avons choisi un niveau d'intégration « vertical », intégrant les données disponibles sur chaque voie de signalisation, définies par le type de récepteur impliqué.

En effet, malgré la complexité et la connectivité multiple des voies de signalisation, évoquées ci-dessus, il existe effectivement des familles de récepteurs homogènes, capables d'interpréter les signaux provenant de familles de ligands bien définies ; c'est autour de cet axe ligand-récepteur que l'ouvrage est articulé. Ce choix, s'il est cohérent et permet une présentation didactique des modules de signalisation, entraîne toutefois des difficultés au niveau de ces « voies finales communes » de la signalisation que sont les facteurs de transcription, qui sont activés dans de multiples voies et jouent de multiples rôles. Il nous fallait soit faire un chapitre spécial sur ce sujet, soit les disperser au niveau des voies de signalisation auxquelles ils sont liés de façon prépondérante. C'est ce dernier choix que nous avons fait. De même, il aurait peut-être fallu un chapitre sur les petites protéines G, ces médiateurs ubiquitaires et pléiotropes ; là encore, nous les avons intégrés dans les voies les plus pertinentes où ils apparaissent.

Nous avons identifié un certain nombre d'axes de signalisation ligand-récepteur ; il en existe d'autres. Nous n'avons pas individualisé celui de la famille TNF-TNFR (*Tumor necrosis factors – Tumor necrosis factor receptors*), que nous avons en fait traité dans le chapitre sur l'apoptose. Nous n'avons pas retenu l'étude des récepteurs à activité phosphatase (s'ils existent) ni des guanylyl cyclases membranaires (ont-elles une fonction de récepteur ?) Nous n'avons présenté que très brièvement les sélectines et les autres molécules d'adhésion, en appendice au chapitre sur les intégrines, et avons fait l'impasse sur la communication au niveau des jonctions intercellulaires. Nous n'avons pas abordé la signalisation sensorielle dans le chapitre dévolu aux récepteurs couplés aux protéines G, et n'avons qu'effleuré l'immense domaine de la signalisation nerveuse et neuromusculaire.

Nous souhaitons que cet ouvrage remplisse son rôle, qui est d'être un vade mecum de l'oncologue tout au long des quelques années qui séparent sa publication de l'obsolescence ; car il est certain que, très vite, bien des chapitres seront périmés (certains le sont dès maintenant). Accompagnant le lecteur dans le dédale des nouvelles thérapies ciblées sur les mécanismes de l'oncogenèse, il devrait lui permettre de situer chaque nouvelle proposition de l'industrie pharmaceutique à sa juste place dans l'apparent fouillis de la signalisation cellulaire, que nous avons essayé de ne pas rendre inextricable.

Codes couleur pour les schémas

Nous avons essayé d'adopter, dans les figures de cet ouvrage, un « code couleur » homogène, mais cela a été parfois impossible. De façon générale, les kinases sont en bleu, les phosphatases en rouge, les facteurs extracellulaires en orangé, les facteurs de transcription en jaune, les protéines G en vert, les protéines adaptatrices dans tous les tons de pourpre, etc. Mais l'arc-en-ciel ne suffit pas à couvrir la totalité des nuances que nous aurions voulu introduire... Et puis, il y a des exceptions : dans le chapitre sur le cycle cellulaire, nous avons voulu « signaler » chaque phase du cycle par un code couleur qui lui soit propre, et les kinases n'y sont pas toutes bleues.

Liste alphabétique des sigles (en fin de volume)

La biologie cellulaire et moléculaire fait un usage immodéré de sigles, d'abréviations et d'acronymes et il est parfois difficile de se reconnaître dans ce maquis. Certains sont de véritables acronymes simples à décrypter, surtout pour un anglophone (EGFR, *Epidermal growth factor receptor*). D'autres sont des abréviations comme AREG pour *Amphireguline*. Beaucoup de ces acronymes et abréviations sont devenus des noms qui désignent une protéine ou un gène par un sigle dont le sens original est oublié (il est heureux parfois que ce sens original ait été oublié, car souvent ces sigles rappellent une propriété ou une origine tissulaire qui s'est révélée inexacte ou partielle). Qui se souvient et juge important que RAS a été forgé à partir de *Rat sarcoma* ? D'autres sigles enfin n'ont jamais eu de justification, et nous offrons un exemplaire de ce livre au premier qui nous donnera l'origine étymologique du nom de la protéine AKT.

Pour les noms des protéines et des facteurs divers, nous avons essayé de nous conformer à l'usage le plus courant, tout en le rationalisant quand cela est nécessaire, en utilisant le plus souvent les lettres capitales. Nous avons fait, dans ces sigles et ces codes, un usage aussi limité que possible des traits d'union, des lettres minuscules, des lettres grecques, nous conformant souvent à la nomenclature des gènes, auxquels nous avons conservé les italiques de rigueur.

Un autre problème réside dans le fait que de nombreux facteurs existent sous différentes formes protéiques codées par des gènes distincts : doit-on parler de la protéine AKT ou des protéines AKT1, AKT2 et AKT3 ? De la protéine RAS ou des protéines K-RAS, H-RAS et N-RAS ? Nous avons préféré le plus souvent utiliser les noms génériques (AKT, RAS), n'entrant dans le détail des homologues que lorsque cela était nécessaire. De même, le produit de chaque gène existe souvent sous des formes multiples, résultant d'épissages alternatifs. Les fonctions individuelles de chaque isoforme ne sont généralement pas connues, sauf pour de rares exceptions : nous n'avons même pas indiqué l'existence de ces variants dans la plupart des cas.

S'agissant de la description de voies de signalisation, nous avons presque toujours parlé des protéines, et non des gènes ; la nomenclature des gènes est « officielle », celle des protéines est plutôt usuelle et nous avons essayé de les faire correspondre ; il serait nécessaire de les harmoniser. Parler de la protéine CHK1 et de son gène *CHEK1* ne facilite pas la compréhension du lecteur... C'est encore plus vrai pour les protéines p21^{CIP1} ou p16^{INK4a} et leurs gènes, *CDKN1A* et *CDKN2A*. Heureusement, le nom officiel du gène codant pour la protéine MTOR vient de changer : ce n'est plus *FRAP1*, c'est maintenant *MTOR*. Mais cela ne résout qu'un problème sur mille ! Nous espérons que ce « lexique des symboles » aidera le lecteur à identifier les acteurs des voies de signalisation au fur et à mesure qu'il fera leur connaissance. Il est à la fois un glossaire permettant de déchiffrer les acronymes, un lexique présentant les acteurs des voies de signalisation étudiées dans cet ouvrage, et un index indiquant le chapitre principal où l'on traite de la protéine ou du sujet.

Introduction

Principes généraux de la signalisation cellulaire

Des récepteurs aux effecteurs

La communication cellulaire est indispensable à la vie des organismes pluricellulaires : les cellules doivent impérativement échanger les informations nécessaires à la coordination de leurs actions. Pourtant, elle existe déjà dans les organismes unicellulaires comme les levures qui doivent, elles aussi, échanger des informations, ne serait-ce que pour trouver des partenaires sexuels. Les principes de la communication cellulaire sont universels : des molécules de signalisation sont émises par une cellule, reconnues par une autre, qui met alors en œuvre une voie de transduction du signal reçu, qui aboutit à un système effecteur qui prend en compte le signal. La variété des systèmes de transmission de l'information est immense, tant au niveau de la réception des signaux qu'à celui de la mise en jeu des effecteurs. Pourtant, il est certainement possible de trouver des *patterns* généraux, des structures communes du cheminement de l'information, pour peu que l'on se donne la peine de les rechercher.

Pour ce qui concerne la première étape, celle de la réception, les mécanismes sont dépendants de la nature chimique des messagers :

- les messagers de nature hydrophile (acides aminés et leurs dérivés, peptides, protéines) ne peuvent entrer dans les cellules, faute de pouvoir traverser les membranes ; il existe donc nécessairement un récepteur membranaire apte à recevoir le message, à le comprendre, et à transduire l'information au-delà ;
- les messagers de nature lipidique (dérivés stéroïdiens, acides gras et leurs dérivés, etc.) et les composés de structure très simple (oxygène, oxyde nitrique) sont capables de diffuser à travers les membranes et d'atteindre directement leurs cibles, dans le cytoplasme ou dans le noyau (récepteurs nucléaires) ;
- les messagers de nature ionique (Na^+ , K^+ , Cl^- et Ca^{2+}) sont capables d'induire l'ouverture ou la fermeture transitoire de canaux ioniques permettant la génération de courants transmembranaires ; ces courants correspondent au passage de l'influx nerveux dans les neurones, mais ils sont aussi à l'origine de nombreux événements intracellulaires.

La transduction des signaux perçus par les récepteurs fait intervenir de multiples processus, mais les mécanismes généraux mis en jeu sont en petit nombre, les principaux étant :

- le « recrutement » de protéines capables de contracter des interactions avec d'autres : il existe ainsi de très nombreuses protéines « adaptatrices » ;
- les réactions de phosphorylation et de déphosphorylation par des kinases et des phosphatases, qui modifient la conformation tridimensionnelle des protéines, donc leur réactivité ;
- la mise en jeu de petites protéines G selon un mécanisme quasi constant d'échange et d'hydrolyse de nucléotides guanyliques ;
- la production de « seconds messagers » intracellulaires relayant l'information apportée au niveau de la membrane.

Enfin, les effecteurs sont également très divers, mais, là encore, il est possible de les regrouper en quelques entités :

- les régulateurs transcriptionnels, couramment appelés « facteurs de transcription », qui commandent la transcription de gènes cibles ; ce sont les effecteurs les plus généraux et les plus souvent rencontrés en aval des voies de transduction des signaux ;
- les régulateurs traductionnels, qui sont directement mis en jeu dans quelques voies de signalisation et qui interviennent sur le niveau de synthèse protéique ;
- les protéines du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire, qui commandent les phénomènes d'adhésion, de motilité et de dispersion cellulaires ;
- les canaux ioniques enfin, que l'on retrouve ici en tant qu'effecteurs, mis en jeu en particulier, mais pas seulement, dans la transmission synaptique.

La cellule dispose ainsi d'une « boîte à outils » standard dans laquelle elle peut puiser pour comprendre l'information qu'elle reçoit et exécuter les consignes qui lui sont ainsi apportées. C'est peut-être cet aspect de « bricolage » qui est déroutant pour celui qui aborde l'étude de la signalisation cellulaire : il retrouve des molécules communes, des domaines protéiques identiques, des facteurs de transcription similaires dans des voies de transmission des signaux en apparence indépendantes. Par exemple, des « motifs EGF » se rencontrent dans les facteurs de croissance « de la famille de l'EGF », mais aussi dans des récepteurs de la voie Notch et de la voie des intégrines. On peut finir par avoir l'impression (désastreuse) que « tout est dans tout, et réciproquement ».

La signalisation cellulaire peut s'exercer à des distances très variables ; le premier vrai système de signalisation identifié, dès la fin du XIX^e siècle, est le système endocrine, dans lequel un organe spécifique (glande endocrine) sécrète dans le courant sanguin des molécules (hormones) destinées à des cellules fort éloignées. Il a fallu ensuite forger le mot « paracrine » lorsqu'ont été identifiées des molécules agissant sur des cellules voisines de celle qui les produit ; puis le terme « juxtacrine » lorsque la transmission du signal s'effectue à travers des jonctions communicantes ; puis enfin le terme « autocrine » quand les signaux émis par une cellule sont capables, après avoir transité dans le milieu extracellulaire, de revenir exercer un effet sur la même cellule. Gardons en mémoire la spécificité de la transmission synaptique de l'information, entre cellules nerveuses ou neuromusculaires.

À côté de la signalisation entre cellules existe bien sûr une signalisation intracellulaire. Les deux types de communication sont enchevêtrés et difficilement séparables. Cette signalisation intracellulaire est en particulier véhiculée par les seconds messagers évoqués ci-dessus, mais aussi par nombre de protéines synthétisées en réponse à toutes sortes de sollicitations. Par ailleurs, c'est à l'intérieur de la cellule que convergent les multiples informations reçues de l'extérieur et que doit se faire l'intégration de toutes ces informations, qui peuvent être synergiques ou au contraire divergentes.

Pour rester schématique, on peut dire que les informations transmises d'une cellule à une autre correspondent à six grands types de consignes à exécuter, antithétiques deux à deux : se reproduire ou se différencier ; demeurer attaché ou migrer ; survivre ou mourir. Nous pourrions distinguer, en première approximation, des « voies de prolifération », des « voies de motilité » et des « voies de survie cellulaire ». Mais ce sont souvent les mêmes signaux qui donnent ces différents ordres : les messages de prolifération sont aussi des messages de différenciation ; les récepteurs de messages de mort peuvent promouvoir aussi la survie cellulaire.

Dans l'étude des voies de signalisation, il faut abandonner d'emblée le modèle linéaire établi par les endocrinologistes à la fin du XIX^e siècle : *un* ligand, *un* récepteur, *un* message, *une* action physiologique ; le modèle de la clé unique pour une serrure unique. En fait, le même ligand peut reconnaître plusieurs récepteurs apparentés, le même récepteur peut recevoir des messages provenant de différents ligands, les messages intracellulaires transmis après activation du récepteur sont multiples et les actions physiologiques variables d'un tissu à l'autre. C'est l'équipement individuel de chaque cellule ou tissu en récepteurs et en systèmes de transduction qui fera que le même message entraîne parfois une division de la cellule et parfois une différenciation. L'action des messages envoyés par une cellule à une autre est pléiotrope et dépend du « contexte cellulaire ».

Signalisation cellulaire et cancer

Nous ne souhaitons pas ici développer l'étude des mécanismes de l'oncogenèse, mais présenter simplement quelques caractéristiques des cellules malignes montrant combien les altérations de la signalisation cellulaire sont au cœur de ces mécanismes. La cellule cancéreuse est avant tout une cellule génétiquement instable, capable d'explorer les fonctions de l'ensemble du génome et de mettre à profit tout avantage prolifératif ou migratoire pour le sélectionner et le transmettre à sa descendance. Prolifératif, en ce sens qu'une tumeur est, par définition, une néoformation nécessitant une multiplication cellulaire toujours active ; et migratoire, pour ne pas dire invasif, parce que le support de la malignité des cancers est lié à leur aptitude à disséminer dans l'organisme. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et dans la différenciation, dans l'adhésion et dans la migration, dans la survie et dans la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. On a pu dire ainsi que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire.

Dans une revue générale élaborée vingt-cinq ans après la découverte du premier oncogène, Hanahan et Weinberg ont classé les mécanismes de l'oncogenèse en six grandes familles ; leur contribution reste toujours valable dix ans après :

- autosuffisance en facteurs de croissance ;
- insensibilité aux facteurs inhibiteurs de la croissance ;
- évasion de l'apoptose ;
- néo-angiogenèse ;
- invasion et métastase ;
- potentiel réplicatif illimité.

On peut ajouter un dernier type de mécanisme, qui sous-tend l'acquisition de tous les autres, l'instabilité génétique. Pour les cinq premiers de ces mécanismes, on trouvera presque toujours une anomalie dans la transmission de l'information, une mutation dans une protéine de transduction des signaux, une « maladie de la signalisation » ; et c'est sans doute parce que nous ne savons pas encore comment se déclenche la réactivation de la télomérase dans les cancers que nous l'en avons exclue provisoirement.

La cellule cancéreuse fait feu de tout bois ; la situation serait simple si elle détournait simplement les mécanismes qui contrôlent la prolifération et la migration des cellules épithéliales, d'où sont issus la grande majorité des cancers ; mais elle est capable d'aller chercher des voies insoupçonnées, impliquées dans l'inflammation, dans l'immunité, dans la polarité cellulaire, dans la migration axonale, dans les jonctions intercellulaires et dans bien d'autres phénomènes spécialisés dont le déroulement semblait limité à un tissu particulier, à une étape précise du développement. Pour comprendre ce détournement des voies de signalisation qu'exercent les cellules cancéreuses, il ne faut pas se limiter à l'étude de ce qui paraît évident, mais aller chercher l'inhabituel, le méconnu, voire l'exceptionnel.

La connaissance des mécanismes de l'oncogenèse et celle des perturbations des voies de signalisation dans les cancers a permis l'émergence du concept de thérapie ciblée. Alors que les médicaments de la chimiothérapie classique ont pour cible les mécanismes impliqués dans la multiplication cellulaire, qu'elle soit normale ou néoplasique, les thérapeutiques ciblées s'adressent aux mécanismes mêmes de l'oncogenèse et devraient donc avoir une spécificité importante pour les cellules cancéreuses. Ce que l'on cible, dans les thérapeutiques ciblées, ce sont les protéines impliquées dans le *contrôle* de la prolifération et de la mort cellulaires et non celles impliquées dans l'*exécution* de ces programmes, c'est la *cause* de l'anomalie à l'origine d'un cancer et non plus l'*effet* qui en résulte. Ces thérapies ont émergé lorsque la compréhension de la biologie des cancers a atteint un niveau suffisant et que les outils permettant d'interférer avec la transformation maligne ont été disponibles.

L'une des premières connexions bibliographiques que l'on peut rechercher entre signalisation cellulaire et traitement des cancers conduit aux Actes d'un symposium tenu à Cambridge (UK) en septembre 1989, publiés dans la revue *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Et déjà on y disait que « *the idea that cell membranes and intracellular signal cascades could become the target of antitumor drugs has come of age* ». L'idée était pourtant encore toute neuve, puisqu'il a fallu dix ans de plus pour qu'apparaissent les premières thérapeutiques ciblées.

Chapitre 1

Les facteurs de croissance et les récepteurs à activité tyrosine kinase

Introduction

La signalisation apportée par les facteurs de croissance est certainement la mieux connue en raison, en particulier, de son rôle dans l'oncogenèse. Elle ouvre en fait sur de multiples voies de transduction que nous avons distribuées en plusieurs chapitres ; celui-ci concerne exclusivement les facteurs de croissance et leurs récepteurs ; les chapitres 2 et 3 présenteront les principales voies de signalisation qui sont activées en aval de l'interaction d'un facteur de croissance et d'un récepteur. Les facteurs de croissance et leurs récepteurs sont classés en fonction du mécanisme de l'activation de ces derniers : la classe principale est celle des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) que nous étudierons ici, une autre classe est celle des récepteurs activant une tyrosine kinase cytoplasmique qui seront étudiés au chapitre 4, une troisième celle des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase (chapitre 5).

L'activation des RTK se fait selon un schéma général de fonctionnement unique, impliquant la dimérisation puis l'autophosphorylation croisée des récepteurs, permise grâce à leur activité tyrosine kinase, qui constitue le point de départ de la voie de signalisation. La réponse cellulaire aux facteurs de croissance est conditionnée par la nature des associations des dimères de récepteurs ; il existe une « combinatoire » souvent complexe de ces associations, qui détermine le type d'action exercée sur la cellule recevant le signal. Les combinaisons possibles sont nombreuses et expliquent pourquoi le même signal peut entraîner des conséquences différentes au niveau cellulaire : prolifération et différenciation pourront être induites par le même message sur des cellules distinctes. Enfin, les voies de signalisation en aval de l'interaction facteur de croissance-RTK sont multiples et dépendent du contexte cellulaire.

Généralités sur les facteurs de croissance et les RTK

Présentation

Il existe plusieurs centaines de facteurs de croissance capables d'activer un RTK et plusieurs dizaines de récepteurs capables de les reconnaître. Les uns et les autres sont regroupés en familles protéiques homologues correspondantes : les facteurs de croissance de la famille de l'EGF (*Epidermal growth factor*) interagissent avec les récepteurs de la famille des récepteurs de l'EGF, et ainsi de suite. Les dénominations de facteurs de croissance « épidermique » ou « fibroblastique » sont liées aux circonstances de leur découverte plus qu'à une spécificité de tissu cible ; des tissus épithéliaux peuvent exprimer des récepteurs de facteurs de croissance fibroblastiques, des tissus non épithéliaux des récepteurs de facteurs de croissance épidermiques.

Les facteurs de croissance sont des polypeptides transmettant des messages mitogènes, c'est-à-dire susceptibles de provoquer le déclenchement d'une mitose. Ils sont sécrétés par de nombreux types cellulaires non organisés en glandes et agissent le plus souvent à faible distance de leur origine. Par analogie et par opposition aux hormones qui sont véhiculées dans le sang (système endocrine), on dira que les facteurs de croissance sont des facteurs paracrines (agissant au voisinage de la cellule qui leur a donné naissance), parfois juxtacrines (agissant sur la cellule liée par jonction serrée à la cellule d'origine), et même autocrines (agissant sur la cellule même qui les a produits).

Le tableau 1-1 présente quelques-unes des principales familles de facteurs de croissance et de leurs récepteurs. Ce sont près de soixante RTK répartis entre une vingtaine de familles que l'on peut dénombrer, et le nombre de facteurs de croissance correspondants est bien supérieur. Tous les RTK possèdent un seul domaine transmembranaire, une partie intracellulaire homologue qui porte l'activité catalytique, et une partie extracellulaire très variable d'une famille à l'autre. Cette partie extracellulaire est subdivisée en domaines protéiques divers, possédant des séquences caractéristiques (domaines riches en cystéine, domaines acides, domaines *immunoglobulin-like*, etc.) présentées sur la fig. 1-1. Le mode d'activation de tous les RTK est analogue : il comporte une dimérisation du récepteur, qui permet l'autophosphorylation de résidus tyrosine du domaine intracellulaire. La présence de phosphotyrosines constitue le véritable signal permettant la mise en œuvre d'une voie de transduction conduisant à l'activation des effecteurs.

Ces phosphotyrosines seront reconnues par des protéines dotées de domaines de liaison que l'on appelle domaines SH2 (*SRC homology domain 2*) et PTB (*Phosphotyrosine binding*). Ces protéines sont susceptibles de reconnaître de façon très spécifique les différentes tyrosines phosphates du récepteur activé. On a identifié une centaine de protéines porteuses d'un domaine SH2 et 35 d'un domaine PTB. Deux types de signalisation peuvent alors être mis en œuvre :

- des protéines cytoplasmiques à domaine SH2 ou PTB peuvent être phosphorylées et activées par le récepteur au niveau de résidus tyrosine, mettant en œuvre ensuite

Tableau 1-1 – Les principales familles de récepteurs de facteurs de croissance.

Familles	Récepteurs	Ligands
Récepteurs de l'EGF	EGFR ERBB2 ERBB3 ERBB4	EGF TGF α HBEGF Epigène (EPGN) Epiréguline (EREG) Bétacelluline (BTC) Amphiréguline (AREG) Neurégulines 1 à 4 (NRG1-4)
Récepteurs des FGF	FGFR1 FGFR2 FGFR3 FGFR4	FGF1 à FGF10 FGF15 à FGF23
Récepteurs du VEGF	FLT1 (VEGFR1) KDR (VEGFR2) FLT4 (VEGFR3)	VEGFA à VEGFD
Récepteurs du PDGF et récepteurs apparentés	PDGFR α PDGFR β KIT FLT3 CSF1R	PDGFA à PDGFD SCF/KITLG FLT3LG CSF1
Récepteurs de l'insuline	INSR IGF1R [IGF2R] INSRR	Insuline IGF1 IGF2
Récepteurs des angiopoïétines	TIE1 TEK (TIE2)	- ANGPT1-4
Récepteur de l'HGF	MET MST1R (RON)	HGF/SF MST1
Récepteur RET	RET	GDNF
Récepteurs des éphrines	EPHA1-A8 EPHB1-B6	EFNA1-A5 EFNB1-B3
Récepteurs NTRK	NTRK1 NTRK2 NTRK3	NGF BDNF NT3, NT4
Récepteurs TAM	AXL MERTK TYRO3	GAS6 PROS1
Récepteurs DDR	DDR1 DDR2	Collagènes
Récepteurs LTK	LTK ALK	PTN MDK
Récepteurs ROR	ROR1 ROR2	Protéines WNT

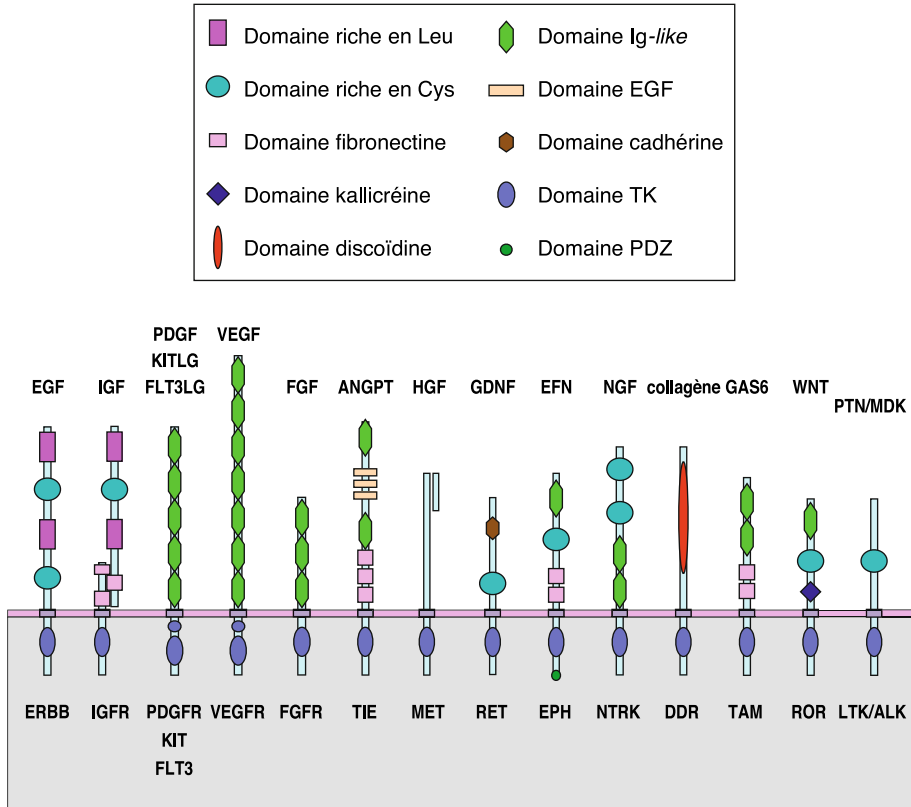


Fig. 1-1 – Les récepteurs à activité tyrosine kinase.

Les noms abrégés des récepteurs sont indiqués en dessous, les noms des ligands au-dessus. Les RTK diffèrent surtout par leur partie extracellulaire, qui contient des domaines protéiques caractéristiques susceptibles de porter des fonctions originales : domaines riches en leucine, domaines riches en cystéine, domaines *immunoglobulin like*, domaines cadhérine, domaines fibronectine III, domaines EGF, etc. La partie intracellulaire contient essentiellement le domaine catalytique, à fonction tyrosine kinase, et dans les cas des récepteurs des éphrines, un domaine PDZ leur conférant des propriétés originales.

- les actions résultant de leur phosphorylation. Certaines sont des tyrosine kinases cytoplasmiques comme SRC (pour *Sarcoma*) ou JAK (*Janus kinase*, chapitre 4), des tyrosine phosphatases comme SHP1 (*SH2 domain containing phosphatase 1*), la phospholipase C gamma (PLC γ) ; d'autres sont des protéines adaptatrices (*docking proteins*) dont la phosphorylation permet ensuite la transmission du message.
- des protéines cytoplasmiques adaptatrices, possédant également un domaine de reconnaissance SH2 ou PTB, peuvent être recrutées par l'activation du récepteur, sans phosphorylation subséquente. Elles aussi sont susceptibles de reconnaître de façon très spécifique les tyrosines phosphates du récepteur activé. Citons comme exemples la protéine GRB2 (*Growth factor receptor binding protein 2*) qui est une des

principales entrées vers la voie des MAP kinases (chapitre 2), et la protéine p85 ou PIK3R1 qui ouvre la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (chapitre 3) dont elle constitue une sous-unité régulatrice.

Altérations oncogéniques

Des mutations ou une surexpression de facteurs de croissance peuvent probablement jouer un rôle important dans l'oncogenèse, mais le rôle primaire des altérations moléculaires de facteurs de croissance dans l'oncogenèse a été rarement démontré ; en revanche, des mutations germinales inactivatrices de facteurs de croissance sont responsables de nombreuses pathologies héréditaires comme le nanisme. Au niveau des récepteurs des facteurs de croissance, de nombreuses altérations sont rencontrées dans les cancers, et c'est à ce niveau que l'on a identifié le plus grand nombre de proto-oncogènes. Nous citerons les altérations principales au fur et à mesure de la présentation des familles de récepteurs, sans pouvoir être exhaustif.

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs constituent l'un des plus riches ensembles de cibles pharmacologiques en cancérologie et le développement des thérapies ciblées s'est en grande partie appuyé sur la recherche de molécules susceptibles d'inhiber les voies de signalisation de la prolifération dès les premières étapes. La majeure partie des succès obtenus à ce jour concerne précisément les facteurs de croissance et leurs récepteurs.

Cibles pharmacologiques

Le ciblage des facteurs de croissance peut être réalisé à l'aide de molécules qui les piègent et bloquent leur action dans le milieu extracellulaire. On peut envisager l'utilisation de récepteurs solubles, d'aptamères, d'anticorps. La réussite majeure à ce jour concerne un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre un facteur de croissance, le bevacizumab, dont l'action anti-angiogène est mise à profit dans le traitement des cancers colorectaux. Des anticorps dirigés contre d'autres facteurs de croissance sont en cours de développement préclinique et clinique.

Le ciblage des récepteurs de facteurs de croissance peut être réalisé au niveau extracellulaire par un anticorps monoclonal ou au niveau intracellulaire par une petite molécule inhibitrice de l'activité tyrosine kinase du récepteur (ITK). Plusieurs récepteurs ont fait l'objet d'un développement pharmacologique couronné de succès, et le ciblage de nombreux autres fait l'objet de recherches intenses. Il faut souligner que, si les anticorps sont par définition spécifiques d'une molécule donnée, il n'en est pas de même des inhibiteurs de tyrosine kinase qui peuvent présenter une affinité préférentielle pour des récepteurs précis tout en agissant sur d'autres récepteurs avec une activité moindre, mais souvent significative. Certains ITK sont ainsi des composés « multicible », et il est parfois difficile de savoir quel est le récepteur réellement impliqué dans leur activité. Le tableau 1-2 présente les principaux ITK développés à ce jour et les cibles, souvent multiples, qu'ils inhibent.

Tableau 1-2 – Quelques inhibiteurs de tyrosine kinase.

ITK	Nom de code	Laboratoire	Cible	Phase de développement
Gefitinib	ZD1839	Astra-Zeneca	EGFR (réversible)	AMM (Iressa®)
Erlotinib	OS-774	Roche	EGFR (réversible)	AMM (Tarceva®)
Lapatinib	GW572016	GSK	EGFR, ERBB2	AMM (Tyverb®)
Canertinib	CI-1033	Pfizer	Pan-ERBB (irréversible)	Phase II
	BIBX1382BS	Boehringer-Ingelheim	EGFR (réversible)	Phase II
	PKI-166	Novartis	EGFR, ERBB2	Phase II
	GW-2016	GSK	EGFR, ERBB2	Phase I
Neratinib	HKI-272	Wyeth	EGFR, ERBB2, (irréversible)	Phase II
	EKB-569	Wyeth	EGFR, ERBB2, (irréversible)	Phase II
Vandetanib	ZD6474	Astra-Zeneca	EGFR, FGFR1, VEGFR2, RET	Phase III
	AEE788	Novartis	EGFR, ERBB2, VEGFR2	Phase I
Sunitinib	SU-11248	Pfizer	VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, FGFR1	AMM (Sutent®)
Sorafenib	BAY-439006	Bayer	B-RAF, RET, VEGFR, FGFR1, FLT3	AMM (Nexavar®)
Vatalanib	PTK787/ZK222584	Novartis	VEGFR, KIT	Phase III
Axitinib	AG-013736	Pfizer	VEGFR, PDGFR, KIT	Phase III
Semaxinib	SU-5416	Pharmacia	KIT, FLT3, VEGFR2	Arrêté
Cediranib	AZD-2171	Astra-Zeneca	VEGFR, PDGFR	Phase III
Motesanib	AMG-706	Angen	VEGFR, PDGFR, RET, KIT, FLT3	Phase II
Pazopanib	GW-786034	GSK	VEGFR, PDGFR	Phase III
Imatinib	STI-571	Novartis	BCR-ABL, KIT, PDGFR	AMM (Glivec®)
Nilotinib	AMN-107	Novartis	BCR-ABL, KIT, PDGFR, RET	AMM (Tasigna®)
Dasatinib	BMS-354825	BMS	BCR-ABL, KIT, PDGFR	AMM (Sprycel®)
Masitinib		ABScience	FGFR3, PDGFR, KIT	Phase III
Lestaurtinib	CEP-701	Cephalon	FLT3, NTRK, JAK2	Phase III

L'exemple paradigmatique de la famille de l'EGF (famille ERB-B)

Les facteurs de croissance et leurs récepteurs

Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF sont au nombre de onze, dont l'EGF lui-même, le TGF α (*Transforming growth factor α*), l'amphiréguline (AREG), l'épigène (EPGN), l'épiréguline (EREG), l'HB-EGF (*Heparin-binding EGF*), la β -celluline (BTC) et quatre neurégulines (NRG). Ces facteurs jouent un rôle majeur dans la prolifération de nombreux tissus. L'EGF lui-même est une petite protéine soluble de cinquante-trois acides aminés, avec trois ponts disulfure intrachaine (fig. 1-2A), qui dérive d'une protéine transmembranaire plus volumineuse de 1 207 acides aminés, contenant une série de motifs EGF identiques, dont le clivage dans l'espace intercellulaire libère le facteur soluble. L'insertion membranaire de l'EGF « natif » lui permet d'agir sur des cellules jointives à celle qui le porte, ce qui explique les phénomènes de juxtacrinie. Les autres facteurs de la famille de l'EGF sont également synthétisés sous forme d'un précurseur transmembranaire, mais ne comprenant qu'un seul motif EGF extracellulaire. Le clivage des précurseurs transmembranaires en facteurs de croissance solubles et diffusibles est réalisé par une métalloprotéinase TACE (*TNF- α converting enzyme*) ou ADAM17 (*A disintegrin and metalloproteinase*) (fig. 1-2B).

Les onze facteurs de croissance sont reconnus par quatre récepteurs distincts (EGFR ou ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4). Il existe une combinatoire complexe d'interaction de ces onze facteurs de croissance avec les quatre récepteurs susceptibles de les reconnaître et d'activer par leur liaison une voie de signalisation, dont la première phase est une dimérisation, homogène ou hétérogène, de deux molécules de récepteur (fig. 1-3). C'est ainsi que l'EGF, le TGF α , l'amphiréguline et l'épigène ne peuvent activer que l'EGFR lui-même ; l'HB-EGF, l'épiréguline et la β -celluline reconnaissent les récepteurs EGFR et ERBB4 ; les neurégulines 1 et 2 reconnaissent le récepteur ERBB3 et les neurégulines 3 et 4 le récepteur ERBB4. Le récepteur ERBB2 n'a pas de ligand (récepteur « sourd ») et ne peut être homodimérisé dans les conditions normales. Le récepteur ERBB3 n'a pas d'activité tyrosine kinase (récepteur « muet ») : ses homodimères sont inactifs et seuls les hétérodimères transmettent un signal.

L'activation des récepteurs ERB-B

La dimérisation de l'EGFR est permise par le démasquage d'un site de liaison entre deux molécules de récepteur, démasquage provoqué par la liaison de chaque molécule de ligand avec une molécule de récepteur. À l'état inactif, le récepteur est en configuration repliée (*tethered*), ce qui ne permet pas d'interaction entre deux molécules de récepteur (fig. 1-4). La liaison avec l'EGF, au niveau des domaines extracellulaires 1 et 3, permet le passage à une conformation dépliée (*extended*) dévoilant, au niveau du domaine 2, un site de liaison avec une autre molécule de récepteur ayant également fixé une molécule de ligand. Le récepteur ERBB2 n'a pas de ligand car il se

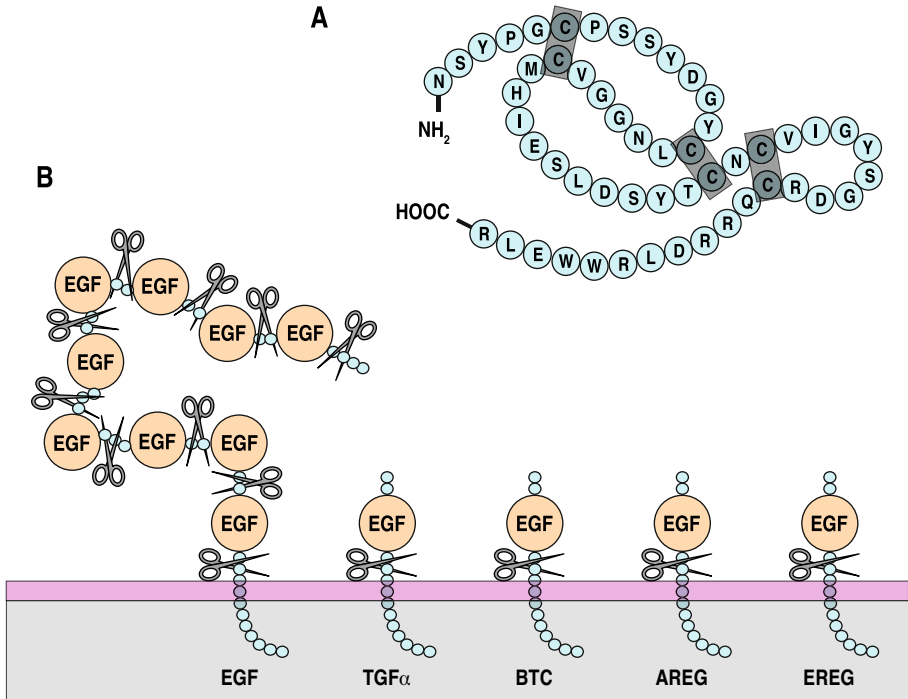


Fig. 1-2 – Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF.

A. Structure primaire de l'EGF, constitué de 53 acides aminés avec trois ponts disulfure intra-moléculaires.

B. Structure générale des ligands de la famille de l'EGF. L'EGF lui-même est synthétisé sous la forme d'un précurseur transmembranaire comportant neuf motifs EGF qui peuvent être clivés par une métalloprotéinase ; les autres facteurs sont également synthétisés sous la forme de pré-curseurs transmembranaires clivables, mais ne comportent qu'un seul motif EGF.

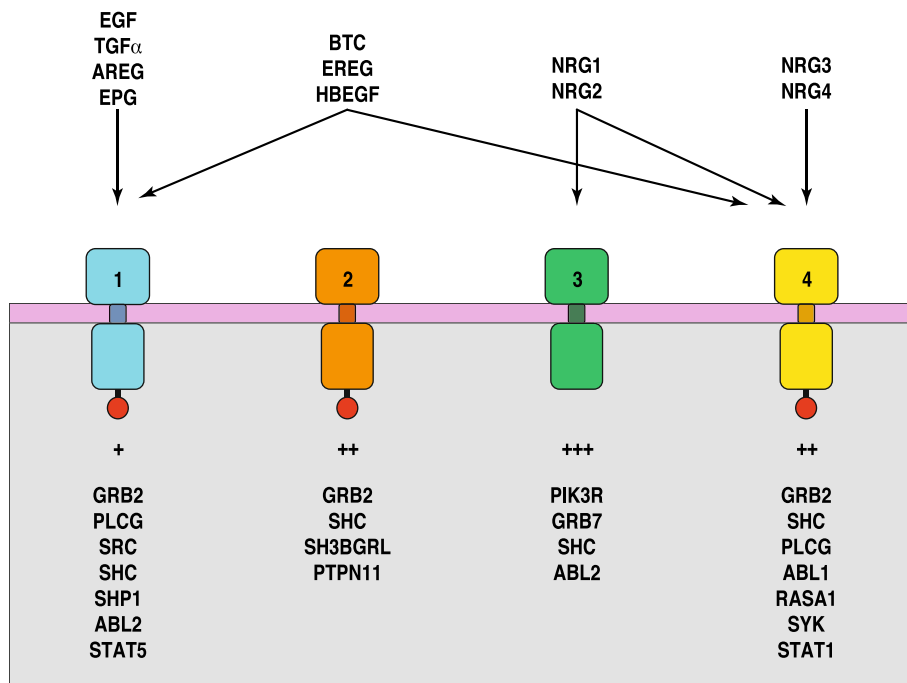


Fig. 1-3 – Facteurs de croissance et récepteurs de la famille ERBB.

Les onze ligands et les quatre récepteurs s'associent selon une combinatoire précise en fonction de l'affinité respective de chaque ligand pour chaque récepteur. Le signal qui en résulte est d'intensité variable selon l'affinité des diverses phosphotyrosines du récepteur pour les protéines dotées de domaines SH2 ou PTB. Le récepteur ERBB2 ne reconnaît aucun ligand et son homodimérisation ne se produit que lorsqu'il est présent en grande quantité dans la membrane. Le récepteur ERBB3 ne possède pas d'activité kinase et son homodimérisation n'est suivie d'aucun signal intracellulaire. Les principales protéines reconnaissant les diverses phosphotyrosines, *via* leur domaine SH2, sont indiquées en dessous de chaque récepteur, et l'importance quantitative de l'interaction représentée par des +.

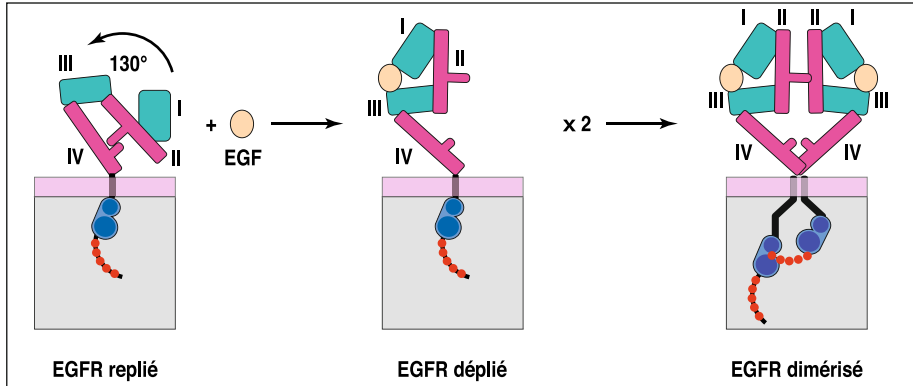


Fig. 1-4 – La dimérisation de l'EGFR.

En absence de ligand, l'EGFR est en conformation repliée et ne peut être dimérisé ; en présence de ligand, il se produit une modification de la conformation du récepteur qui dévoile un site d'affinité au niveau du domaine extracellulaire II. Cette dimérisation permet la mise en contact des domaines intracellulaires et leur phosphorylation réciproque.

présente en permanence dans une conformation dépliée et peut ainsi se dimériser avec les autres récepteurs sans activation préalable.

La dimérisation permet la mise en contact des deux domaines catalytiques intracellulaires. Leur interaction permet l'ouverture du site actif de l'enzyme et l'accessibilité de l'ATP au cœur de ce site, que l'on appelle souvent la « poche à ATP » : une activité tyrosine kinase est alors possible. La disposition dans l'espace des deux domaines catalytiques permet la phosphorylation de résidus tyrosine de chacun d'eux (fig. 1-5). Ces phosphotyrosines sont alors reconnues par des protéines porteuses de domaines SH2 et PTB et les deux types de signalisation présentés précédemment peuvent alors être mis en œuvre, d'une part par l'intermédiaire de kinases et de phosphatases qui sont phosphorylées et activées, comme SRC et SHP1, d'autre part par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme GRB2 ou PIK3R1. Les phosphotyrosines reconnues par chacune de ces protéines ont été identifiées ; par exemple, la protéine SRC reconnaît avec une affinité élevée la phosphotyrosine 974 de l'EGFR, la phosphatase SHP1 la phosphotyrosine 1173, la protéine GRB2 les phosphotyrosines 1148 et 1173, etc. De plus, les différents ligands qui activent l'EGFR n'induisent pas la phosphorylation des mêmes tyrosines : il en résulte des effets spécifiques du TGF α ou de l'AREG par rapport à ceux de l'EGF.

Les différents récepteurs ERBB sont activés par leurs ligands et activent à leur tour les protéines d'aval selon les mêmes mécanismes généraux, mettant en jeu homo- ou hétérodimérisation et autophosphorylation. Outre les diverses combinaisons possibles déjà évoquées (homodimères et hétérodimères) et les facteurs de croissance qui président à leur formation, la figure 1-3 présente les principales protéines qui sont activées par chacun des récepteurs et l'intensité du signal qui résulte de leur activation. Comme les protéines à domaine SH2 ou PTB ont des affinités variables pour les

différentes phosphotyrosines des récepteurs, la nature et l'intensité du signal varient en fonction du dimère formé, des tyrosines phosphorylées et des protéines à domaine SH2 ou PTB disponibles dans la cellule.

Les récepteurs ERBB sont internalisés par endocytose et sont ensuite soit recyclés, soit désactivés par transfert vers les lysosomes. La fixation du ligand accélère l'internalisation et diminue ainsi l'expression du récepteur à la surface de la membrane. L'internalisation se fait dans des vésicules à clathrine et peut être suivie, après transfert dans des endosomes, d'une ubiquitinylation par une E3 ubiquitine ligase (voir Annexe C), la protéine CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*), qui possède un motif de reconnaissance des phosphotyrosines.

Altérations oncogéniques

L'amplification du gène *EGFR* et celle du gène *ERBB2* sont des événements oncogéniques ; pour *EGFR*, cette amplification est rencontrée dans plusieurs cancers épithéliaux, mais son importance dans l'oncogenèse reste discutée ; pour *ERBB2*, une amplification est rencontrée dans 15 à 25 % des cancers du sein, d'autant plus fréquemment que la tumeur est de stade avancé. On la rencontre également dans les cancers gastriques. Le mécanisme par lequel cette amplification survient n'est pas entièrement compris à l'heure actuelle.

Deux grands types de mutations oncogéniques sont rencontrés au niveau de l'EGFR. Le premier type concerne des mutations des domaines extracellulaires dont une partie est amputée, ce qui conduit à une activation permanente du récepteur en absence de ligand. Ces mutations, dont la mutation VIII est la plus fréquente, se rencontrent dans les glioblastomes. Le second type concerne le site catalytique intracellulaire du récepteur (activité tyrosine kinase). Elles ont été identifiées dans un petit contingent de cancers du poumon et rendent accessible en permanence ce site catalytique à l'ATP : elles permettent l'autophosphorylation croisée des résidus tyrosine en absence d'un signal mitogène et d'une dimérisation du récepteur. Ces mutations se rencontrent au niveau de l'exon 18 (G719X), de l'exon 19 (délétions diverses des codons 746-750), de l'exon 20 (rares insertions) et de l'exon 21 (L858R). Comme elles entraînent l'ouverture du site de fixation de l'ATP, elles sont responsables de la sensibilité des cellules tumorales aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur.

Cibles pharmacologiques

L'EGFR peut être reconnu et bloqué par des anticorps ; deux d'entre eux ont été mis sur le marché : le cetuximab (chimérique) et le panitumumab (humain). D'autres sont en développement. Le récepteur ERBB2 peut être reconnu et bloqué par divers anticorps comme le trastuzumab, qui a fait la preuve de son efficacité dans les cancers du sein présentant une amplification du gène *ERBB2*, en situation métastatique

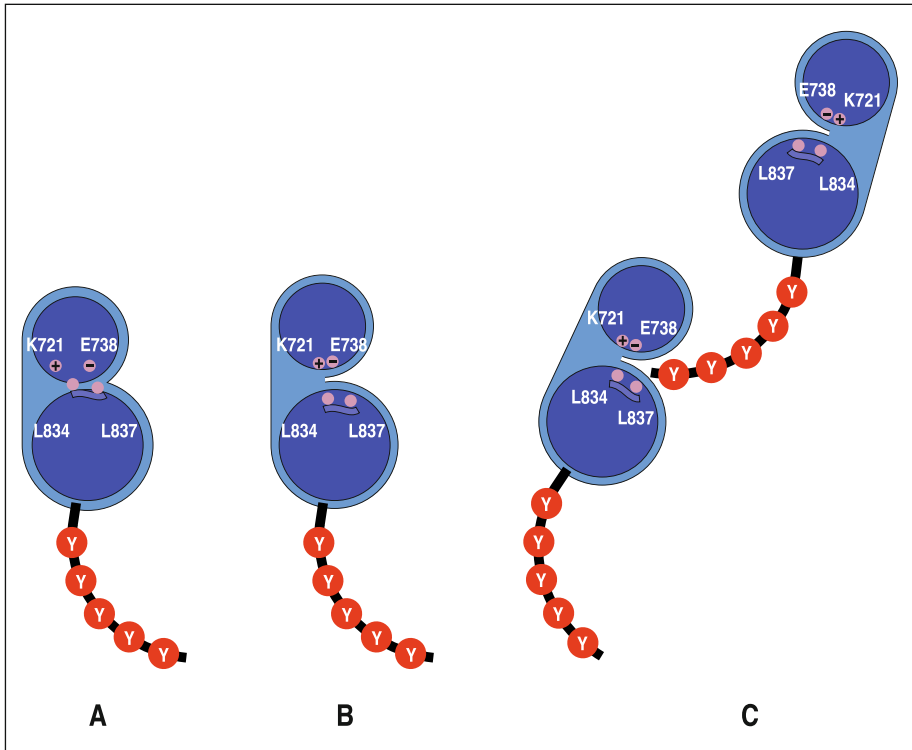


Fig. 1-5 – L'autophosphorylation de l'EGFR.

A. Avant activation du récepteur, le site catalytique est inaccessible pour l'ATP en raison de la présence des deux leucines 834 et 837 ;

B. Lors de l'activation du récepteur, le site catalytique s'ouvre et l'ATP peut réagir avec les acides aminés chargés (lysine 721 et acide glutamique 738).

C. La phosphorylation des tyrosines Y de la deuxième molécule de récepteur est possible grâce à l'activation du récepteur.

comme en situation adjuvante. Les anticorps commercialisés ou en développement ne ciblent pas toujours les mêmes épitopes sur le récepteur cible et peuvent par conséquent avoir un intérêt thérapeutique spécifique.

Deux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR ont été développés : le gefitinib et l'erlotinib. Ces deux ITK sont assez spécifiques de l'EGFR et ne semblent actifs que lorsque existe une mutation activatrice au niveau du domaine tyrosine kinase du récepteur. D'autres ITK présentent une spécificité moindre et une activité croisée sur plusieurs récepteurs ERBB et même sur des récepteurs d'autres familles comme celle des VEGFR. Le lapatinib (actuellement sur le marché), le PKI-166 et le GW-2016 présentent une activité inhibitrice croisée de l'EGFR et de ERBB2. Le caner-tinib et le nératinib, encore au stade du développement, sont capables d'inhiber de façon irréversible l'ensemble des récepteurs ERBB pour le premier, les récepteurs

EGFR et ERBB2 pour le second. Enfin, le vandetanib et l'AEE788 ont une activité croisée sur l'EGFR et le VEGFR2, et il est difficile de savoir quelle est la cible moléculaire la plus pertinente de ces molécules.

Les autres familles de facteurs de croissance

Les facteurs de croissance de la famille du FGF (*Fibroblastic growth factor*)

Il existe plus de vingt facteurs de croissance de la famille du FGF, numérotés à la suite du FGF1 (autrefois appelé FGFA, acide ou alpha) et du FGF2 (FGFB, basique ou bêta). Les FGF ont de multiples rôles dans le développement spécifique de nombreux tissus ; en particulier, le FGF2 joue un rôle important dans l'angiogenèse. Les FGF sont reconnus par quatre récepteurs distincts, de FGFR1 à FGFR4, à l'exception d'un groupe de facteurs, appelés FHF (*FGF homologous factors*) qui n'ont pas de site de liaison avec les récepteurs. L'action des FGF est dépendante de la présence d'un glycosaminoglycane, l'héparane sulfate, qui joue le rôle de corécepteur pour les FGF. Les récepteurs FGFR1, 2 et 3 se présentent sous deux isoformes, b et c, résultant d'un épissage alternatif et exprimées les unes dans les tissus conjonctifs, les autres dans les tissus épithéliaux, et ne se liant pas avec la même affinité à leurs substrats FGF.

Comme pour l'EGFR, la dimérisation du récepteur est à l'origine de son activation. Toutefois, il semblerait qu'un mode de dimérisation distinct soit à l'œuvre ; il impliquerait d'une part l'existence de deux sites de liaison sur le récepteur pour le facteur de croissance, l'un à haute et l'autre à basse affinité ; et d'autre part l'existence d'un site de liaison du récepteur et du facteur de croissance avec l'héparane sulfate. La combinatoire de l'interaction des FGF avec leurs récepteurs est très complexe et la figure 1-6A essaie simplement d'illustrer cette complexité pour les sept premiers facteurs de croissance de la famille FGF seulement. Enfin, l'activation des substrats des tyrosine kinases des FGF implique la phosphorylation intermédiaire de *docking proteins* appelées FRS (*FGF receptor substrate*).

Sur le plan oncogénique, signalons que le FGF3 est l'homologue de l'oncogène murin *Int2* et que ce gène est amplifié dans de nombreuses tumeurs humaines. Par ailleurs, des altérations des FGFR ont été décrites dans de nombreuses tumeurs, principalement des mutations activatrices du domaine kinase ; c'est le cas pour le FGFR1 dans les glioblastomes, du FGFR2 dans les cancers de l'endomètre ou du FGFR3 dans le myélome multiple et les cancers de la vessie. Une translocation t(8;9)(p11;q33) du gène FGFR1 est responsable de la dimérisation spontanée du récepteur dans les syndromes myéloprolifératifs. Enfin, la surexpression du récepteur FGFR1 est un phénomène important retrouvé dans la majorité des cancers de la prostate.

Dans la panoplie des ITK, il n'en existe pas qui ciblent exclusivement, ou même préférentiellement, les récepteurs des FGF. Toutefois, des molécules comme le sunitinib ont une activité importante sur un grand nombre de RTK (voir le paragraphe suivant), y compris les FGFR. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre le FGFR3 sont en développement pour le traitement des cancers de la vessie et du myélome multiple.

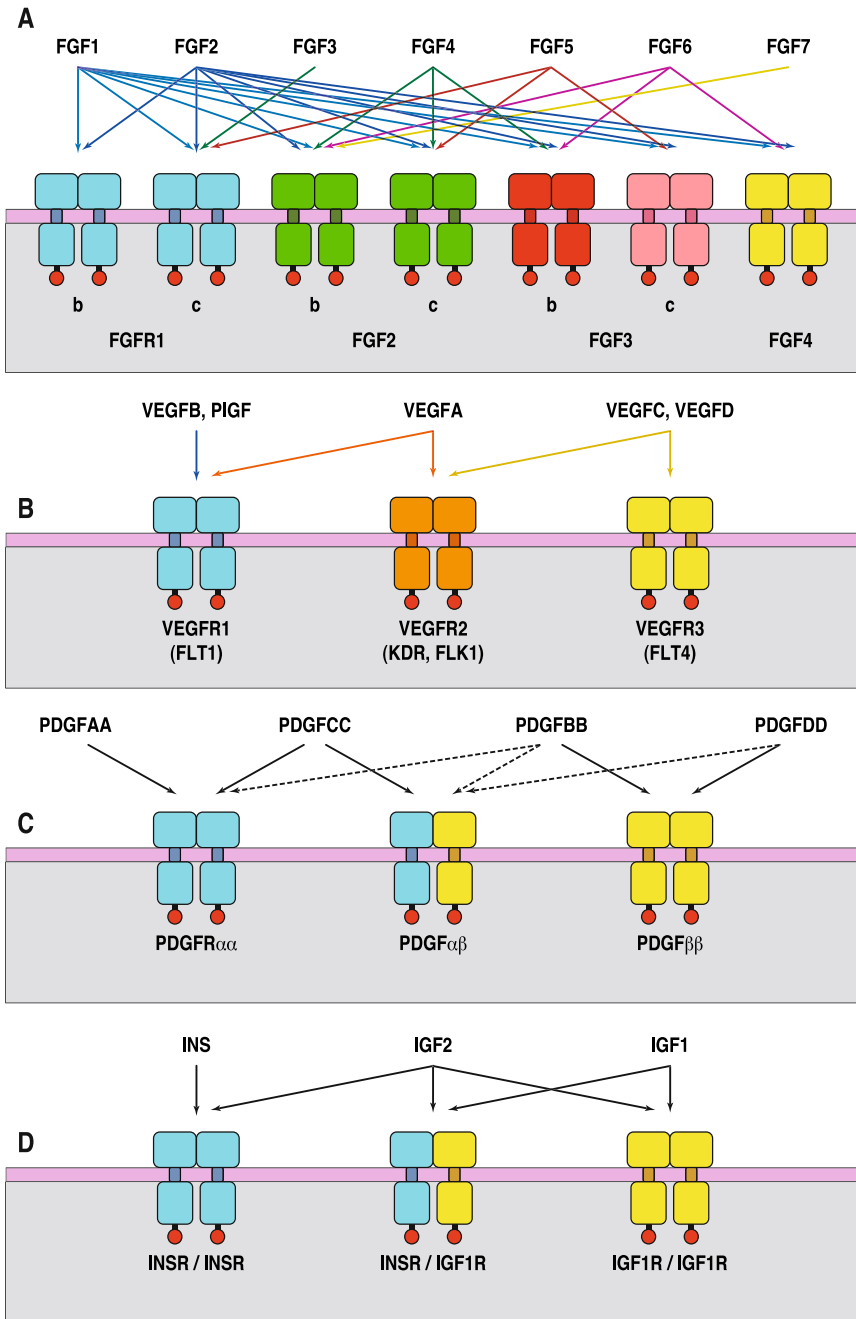


Fig. 1-6 – Facteurs de croissance et récepteurs d’autres familles de RTK

La combinatoire de l’interaction des facteurs de croissance et de leurs récepteurs est présentée pour les sept premiers membres de la famille du FGF (**A**) et pour les membres de la famille du VEGF (**B**), du PDGF (**C**) et des IGF (**D**).

Facteurs de croissance de la famille du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)

Quatre facteurs de croissance vasculo-endothéliaux, VEGFA à VEGFD, ont été identifiés, auxquels il faut ajouter le PlGF ou PGF (*Placental growth factor*) qui en est très proche. Ils sont sécrétés sous forme homodimérique, les monomères étant liés par deux ponts disulfure. Il existe trois récepteurs à activité tyrosine kinase correspondants, VEGFR1 (FLT1, *FMS-like tyrosine kinase 1*), VEGFR2 (KDR, *Kinase insert domain protein receptor* ou FLK1, *Fetal liver kinase 2*) et VEGFR3 (FLT4, *FMS-like tyrosine kinase 4*). Ces facteurs de croissance stimulent plus particulièrement la prolifération des cellules endothéliales, c'est-à-dire de cellules normales, non cancéreuses, mais qui concourent à l'oncogenèse en formant les vaisseaux nécessaires à la nutrition de la tumeur. Le VEGFR2 est le principal médiateur de l'activité pro-angiogénique du VEGF au niveau des tumeurs et le VEGFR3 le médiateur de la lymphangiogenèse. Le VEGFA reconnaît et active les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, le VEGFB et le PlGF reconnaissent et activent le VEGFR1, alors que les VEGFC et D ont pour récepteur le VEGFR3 (fig. 1-6B). Les neuropilines (NRP) 1 et 2 jouent un rôle de corécepteurs du VEGFA, capables de lier le facteur de croissance sans pouvoir transmettre de signal. Elles sont associées aux récepteurs VEGFR1 et R2 et semblent indispensables à leur action. Leur rôle sera décrit dans le chapitre 10.

Il existe plusieurs formes moléculaires du VEGFA, dues à un épissage alternatif (voir Annexe B). La forme principale, le VEGF₁₆₅, est dépourvue du produit de l'exon 6. L'isoforme VEGFA₁₂₁, à laquelle manque le produit des exons 6 et 7, a une très faible affinité pour les glycosaminoglycanes et a par conséquent une diffusibilité très supérieure dans le milieu extracellulaire, alors que les isoformes VEGFA₁₈₆ et VEGFA₂₀₁ ont une forte affinité pour ces composés et restent à la surface des cellules productrices. L'affinité pour les neuropilines diffère également pour ces diverses isoformes, le VEGFA₁₂₁ n'ayant pas de site de reconnaissance.

La production du VEGF par les cellules tumorales, stimulée par divers signaux comme l'inflammation et l'hypoxie, est responsable de la néo-angiogenèse dont les tumeurs en formation ont besoin pour croître au-delà de quelques millimètres. La cellule endothéliale ne participe pas elle-même au phénotype cancéreux et, du fait de la stabilité génétique qui caractérise la nature non cancéreuse des cellules endothéliales dans les tumeurs, les récepteurs du VEGF ne peuvent présenter de mutation oncogénique. Comme nous l'avons mentionné plus haut, un anticorps anti-VEGFA, le bevacizumab, a été commercialisé et son action anti-angiogène est mise à profit dans le traitement des cancers colorectaux et le sera bientôt dans d'autres indications. Une autre approche pour cibler ce même facteur de croissance utilise un pseudo-anticorps, VEGF-trap ou aflibercept, dont le segment Fab est remplacé par la séquence du récepteur impliquée dans la reconnaissance du VEGF : il en résulte une plus grande affinité de ce composé pour le VEGF.

Des anticorps anti-VEGFR sont en cours d'évaluation, mais cette approche n'a pas encore apporté la preuve de son intérêt. De nombreux inhibiteurs de tyrosine kinase ont été développés contre les récepteurs des VEGF, avec une spécificité variable et une

inhibition concomitante d'autres RTK. On ne sait pas encore si cette faible spécificité est un atout ou un inconvénient pour le développement de ces inhibiteurs.

Les ITK dirigés contre les VEGFR actuellement sur le marché sont le sunitinib et le sorafénib, qui avait été sélectionné initialement comme inhibiteur de la sérine/thréonine kinase B-RAF. D'autres molécules sont en développement comme l'axitinib ou le vatalanib (tableau 1-2). La plupart sont également inhibitrices des récepteurs KIT et FLT3 et de ceux du PDGF et des FGF.

Facteurs de croissance de la famille du PDGF

(*Platelet-derived growth factor*)

Quatre facteurs de croissance, PDGFA à PDGFD, ont été identifiés. Ils fonctionnent après dimérisation soit en homodimères AA, BB, CC et DD, soit en hétérodimères AB. L'association des monomères se fait par formation de ponts disulfure. Ils sont reconnus par deux récepteurs, PDGFRA ou α et PDGFRB ou β , qui formeront à leur tour des homodimères $\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$ et des hétérodimères $\alpha\beta$, grâce au fait que le facteur de croissance se présente déjà sous la forme d'un dimère, ce qui permet l'association de deux molécules de récepteur. La combinatoire de l'activation des récepteurs par les facteurs de croissance correspondants n'est pas entièrement connue ; les dimères de ligands PDGFAA et CC activent la formation de dimères de récepteurs PDGFR $\alpha\alpha$ et les dimères de ligands PDGFBB et DD activent la formation de dimères de récepteurs PDGFR $\beta\beta$ (fig. 1-6C). Les actions exercées dépendent évidemment en outre de l'équipement des différents types cellulaires en chaque variété de récepteur.

En raison de la parenté structurale de leurs récepteurs, on a pu rattacher à cette famille d'autres facteurs de croissance : le SCF (*Stem cell factor*) qui reconnaît le récepteur KIT (ou SCFR pour *Stem cell factor receptor*) et dont le nom officiel est KITLG (*KIT ligand*) ; le FLT3 ligand (FLT3LG) qui reconnaît le récepteur FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) ou FLK2 (*Fetal liver kinase 2*) ; et le CSF1 (*Colony-stimulating factor 1*) qui reconnaît le récepteur CSF1R. Ces facteurs de croissance sont souvent appelés des cytokines ; il est à noter que toutes les autres cytokines agissent *via* des récepteurs sans activité tyrosine kinase, mais activant une tyrosine kinase cytoplasmique (voir chapitre 4).

Le *PDGFB* est l'homologue de l'oncogène murin *Sis* ; des mutations de ce gène ont été rencontrées dans des méningiomes, et une translocation réciproque t(22;7) dans une forme rare de sarcome cutané. Les récepteurs PDGFRA et PDGFRB subissent des altérations dans plusieurs types de cancers : syndromes myéloprolifératifs, mastocytose, sarcomes gastro-intestinaux (GIST, *gastro-intestinal stromal tumor*). Ces altérations peuvent être des translocations qui conduisent à des gènes de fusion, ou des mutations activatrices au niveau des exons, 12 (région juxta-membranaire), 14 (domaine kinase) et 18 (bouche activatrice) des récepteurs.

Le récepteur KIT peut être muté au niveau de plusieurs exons (exons 11, 13, 17) et ces mutations activatrices sont rencontrées dans les GIST dont ils constituent

l'altération oncogénique la plus caractéristique. L'amplification du gène *KIT* est rencontrée également dans ces tumeurs. Le récepteur FLT3 est muté dans environ un tiers des leucémies myéloïdes aiguës, en particulier au niveau du domaine juxta-membranaire qui joue un rôle de régulation négative, et au niveau du domaine kinase (acides aminés D835 et I836).

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les parentés structurales entre RTK des familles des récepteurs du VEGF et des récepteurs du PDGF conduisent à des activités croisées des inhibiteurs sur plusieurs récepteurs simultanément : l'activité anti-angiogène et l'activité antitumorale sont difficiles à discerner. L'imatinib, développé initialement dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique en raison de son activité inhibitrice de la tyrosine kinase cytoplasmique ABL, a une activité marquée sur le récepteur KIT qui en fait le premier médicament prescrit dans les GIST. Dans cette indication, le nilotinib et le dasatinib ont également une activité préférentielle pour ce récepteur, mais différent de l'imatinib en ce sens qu'ils conservent leur activité lors de l'émergence de mutations entraînant une résistance à l'imatinib. La définition de stratégies thérapeutiques destinées à optimiser l'utilisation des diverses molécules disponibles est un important sujet de recherche dans cette pathologie.

Facteurs de croissance de la famille de l'insuline

L'insuline, hormone pancréatique bien connue, a certaines des propriétés des facteurs de croissance, tout particulièrement en ce qui concerne son mécanisme d'action, qui passe par l'activation d'un RTK. Les analogues de l'insuline (*Insulin-like growth factors*, IGF ou somatomédines) répondent mieux à la définition des facteurs de croissance, bien qu'ils soient essentiellement produits par un seul organe, le foie. Seuls les tissus concernés par le métabolisme glucidique expriment le récepteur de l'insuline (INSR) alors que de nombreux tissus épithéliaux expriment le récepteur des IGF, appelé IGF1R ou IGFR1. Ces récepteurs ont une structure originale, car ils sont constitués de deux chaînes polypeptidiques, l'une seulement extracellulaire et l'autre surtout intracellulaire, réunies par un pont disulfure. Les homodimères INSR/INSR peuvent être formés par l'insuline et l'IGF2, alors que les homodimères IGF1R/IGF1R et les hétérodimères INSR/IGF1R peuvent être formés par l'IGF1 et l'IGF2 (fig. 1-6D). Il existe un « faux récepteur » des IGF, appelé IGF2R ou IGFR2, qui entraîne la dégradation de l'IGF2, ne peut transduire de signal et se comporte comme un inhibiteur de cette voie de signalisation. L'activation des protéines cibles des récepteurs se fait par l'intermédiaire de *docking proteins*, les IRS (*Insulin receptor substrate*), qui sont phosphorylées par le récepteur et sont ensuite reconnues principalement par la sous-unité régulatrice de la PI3 kinase ; la voie de la PI3 kinase est en effet l'une des principales voies activées par l'insuline et les IGF (chapitre 3).

Sur le plan de l'oncogenèse, il a été suggéré que les taux circulants d'IGF1 pourraient être associés au risque de survenue d'un cancer. Le récepteur de l'insuline et le récepteur IGF1R sont fréquemment surexprimés dans les cellules cancéreuses sans que l'amplification des gènes correspondants ait été notée. En revanche, l'IGF2R joue-

rait un rôle suppresseur de tumeurs plutôt qu'oncogénique : il est en effet capable de se lier à l'IGF2 sans pouvoir transmettre un message, à l'image du récepteur ERBB3 dans la famille des récepteurs de l'EGF. On n'a pas identifié à ce jour de mutations oncogéniques au niveau des récepteurs de cette famille.

Selon le principe du ciblage extracellulaire du facteur de croissance, des anticorps dirigés contre l'IGF1 et l'IGF2 sont en développement préclinique. Le ciblage des récepteurs des IGF est en plein essor ; les approches sont du même type que celles qui sont appliquées aux autres familles : ciblage du récepteur IGF1R par des anticorps comme le figitumumab ou par des inhibiteurs de son activité tyrosine kinase comme le BMS-554417. Dans ce dernier cas, la possibilité d'une inhibition croisée du récepteur de l'insuline fait redouter des effets secondaires métaboliques incompatibles avec le traitement des cancers.

Facteurs de croissance de la famille de l'angiopoïétine

L'angiopoïétine est un facteur de croissance endothélial, comme le VEGF, et joue donc un rôle au niveau de l'angiogenèse, ce qui explique son intérêt potentiel en cancérologie. Comme les gènes des VEGF, la transcription des gènes des angiopoïétines est, entre autres choses, activée par l'hypoxie par l'intermédiaire des protéines HIF (chapitre 16). Il existe deux récepteurs, TIE1 (*Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1*) et TEK (*Tyrosine kinase, endothelial*), encore appelé TIE2, et trois ligands (angiopoïétines 1, 2 et 4, ANGPT 1-4), auxquels s'ajoutent sept facteurs apparentés, les protéines *angiopoietin-like* (ANGPTL 1 à 7), dont le récepteur reste inconnu à ce jour, mais qui ont un effet positif ou négatif, selon les cas, sur l'angiogenèse. Les ANGPT1 et ANGPT4 activent le récepteur TEK, présent exclusivement sur les cellules endothéliales, et stimulent la croissance cellulaire, alors que l'ANGPT2 n'active pas le récepteur et se comporte comme un inhibiteur de cette voie. Les ligands du récepteur TIE1 ne sont pas connus.

Une approche pharmacologique originale de cette voie consiste en un blocage de l'interaction entre angiopoïétine et récepteur TIE2 ; ce blocage peut être réalisé par un *peptibody*, l'AMG386, constitué d'un peptide mimant le ligand couplé à un fragment Fc d'immunoglobuline pour en assurer la stabilité.

Facteurs de croissance de la famille de l'HGF (*Hepatocyte growth factor*)

Le récepteur MET (*Mesenchymal-epithelial transition factor receptor tyrosine kinase*) est un RTK activé par un facteur de croissance nommé HGF (*Hepatocyte growth factor*), connu antérieurement sous le nom de SF (*Scatter factor*). De nombreux cancers mettent en jeu la voie ouverte par activation de MET qui jouerait un rôle majeur dans le processus d'initiation de la métastase lors de la transition épithélio-mésenchymateuse : surexpression d'HGF ou de MET, réarrangement du gène MET,

création de boucles autocrines. Des mutations du domaine kinase de MET se rencontrent dans les cancers du rein. Le récepteur MET et le récepteur apparenté RON (*Récepteur d'origine nantaise*) ou MST1R (*Macrophage stimulating 1 receptor*), dont le ligand est l'HGFL (*Hepatocyte growth factor like*) ou MST1 (*Macrophage stimulating 1*), ont des domaines extracellulaires d'interaction avec les neuropilines qui servent ainsi de corécepteurs à l'HGF (chapitre 10).

Des approches pharmacologiques classiques ciblant le facteur HGF ou le récepteur MET sont en développement : anticorps anti-HGF, anticorps anti-MET, inhibiteurs plus ou moins spécifiques de l'activité tyrosine kinase de MET.

Facteurs de croissance de la famille GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*)

Le récepteur RET (*Rearranged during transfection*) est un RTK impliqué dans le développement normal de la crête neurale. Il possède une parenté structurale avec les cadhérines (chapitre 11). RET est activé par un complexe appelé GDNF qui est constitué d'un ligand GFL (*GDNF family ligand*) et d'un corécepteur GFR α (*GDNF family receptors alpha*). Ses mutations germinales sont associées aux néoplasies endocrines multiples de type II et ses mutations somatiques aux cancers médullaires de la thyroïde.

Plusieurs ITK à large spectre ont montré, au moins *in vitro*, une capacité à inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur RET ; c'est le cas du vandetanib, du sunitinib et du motesanib. Des composés plus spécifiques de RET sont activement recherchés.

Facteurs de croissance de la famille des éphrines

Les récepteurs des éphrines (EPH) constituent le groupe le plus important des RTK (treize membres, répartis en deux groupes A et B). Leurs ligands sont les éphrines (EFN), au nombre de huit, réparties elles aussi en deux groupes A et B, les EFNA pouvant lier tous les EPHA et les EFNB tous les récepteurs EPHB. Les éphrines A sont liées à la membrane de la cellule source par une ancre de glycosyl-phosphatidylinositol (Annexe C), les éphrines de la famille B ayant un domaine transmembranaire. Dans les deux cas, ce sont donc des phénomènes de juxtacrinie qui sont mis en œuvre. Les éphrines sont impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire, de guidage axonal et de développement vasculaire. Leurs actions intracellulaires mettent en jeu en particulier la tyrosine kinase cytoplasmique ABL et des facteurs d'échange de petites protéines G comme RHO. Elles ouvrent des voies originales de régulation positive ou négative de la prolifération, en fonction des événements postérieurs à l'activation des récepteurs, qui sont liés à la nature de la protéine à domaine SH2 qui vient se fixer sur le récepteur activé.

Des altérations de l'expression des récepteurs EPH sont rencontrées dans de nombreux types de cancers et elles semblent concourir à l'oncogenèse soit en tant que promoteurs (surexpression), soit en tant que suppresseurs (perte d'expression) de tumeurs. Des mutations des gènes de certains récepteurs EPH ont également été décrites. Les éphrines et leurs récepteurs sont également impliqués dans l'angiogenèse, ce qui peut en faire des cibles pharmacologiques doublement pertinentes en oncologie. La régulation négative d'EPHA2 par EFNA1 offre un terrain intéressant à la recherche, en particulier grâce à des anticorps dirigés contre EPHA2.

Autres couples facteurs de croissance – RTK

Nous ne ferons que mentionner brièvement les autres RTK ; ils sont moins étudiés et leur implication dans l'oncogenèse est généralement moins claire que pour la plupart des autres récepteurs que nous avons passés en revue.

Récepteurs *NTRK* (*Neurotrophic tyrosine kinase receptor*) ou *TRK* (*Tropomyosin receptor kinase*)

Trois récepteurs (*NTRK1* à 3) et quatre ligands (*NGF* [*Nerve growth factor*], *BDNF* [*Brain-derived neurotrophic factor*], *NT* [*Neurotrophin*] 3 et 4) sont exprimés essentiellement dans le tissu cérébral et interviennent dans le développement du système nerveux. Le *NTRK1* et le *NTRK3* sont surexprimés dans les neuroblastomes de bon pronostic et disparaissent aux stades avancés. À l'inverse, le *NTRK2* et son ligand *BDNF* sont surexprimés dans les neuroblastomes de haut grade, en corrélation avec l'amplification de l'oncogène *MYCN*. Des réarrangements de gènes *NTRK* ont été décrits dans les carcinomes papillaires de la thyroïde et certains sarcomes de l'enfant. Une surexpression de gènes *NTRK* a été observée dans des tumeurs du sein et de la prostate. Le lestaurtinib (CEP-701) est un inhibiteur des *NTRK* (et de *FLT3*) et bloque leur activation ; il est actuellement en phase d'essais cliniques dans les neuroblastomes.

Récepteurs *TAM* (*Tyrosine kinase 3, Axl and Mertk*)

Cette famille contient trois récepteurs, *AXL* (de *Anaxelektos*, qui signifie « non contrôlé » en grec), *MERTK* (*Monocytes, epithelial and reproductive tissues tyrosine kinase*) et *TYRO3* (*Tyrosine kinase 3*), et deux ligands, *GAS6* (*Growth arrest-specific gene 6*) et *PROS1* (*Protein S*). Les récepteurs ont été initialement clonés de cellules leucémiques et considérés comme proto-oncogènes. Ils sont activés par amplification, mais des mutations ou des réarrangements n'ont jamais été rencontrés dans les cancers. En revanche, le niveau d'expression semble relié à la malignité de tumeurs solides, glioblastomes en particulier. Anticorps, petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase ont été proposés en thérapeutique.

Récepteurs DDR (*Discoidin domain receptor*)

Ces deux récepteurs, DDR1 et DDR2, possèdent un domaine extracellulaire unique, homologue de la discoïdine de *Dictyostelium discoideum*. Ce sont en fait des récepteurs du collagène, au même titre que les intégrines (chapitre 11) et ils jouent un rôle dans l'adhésion des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire, d'où leur nom de *Cell adhesion kinases* (CAK). Ils sont surexprimés dans de nombreux types de carcinomes et sont impliqués dans l'invasivité des cancers.

Récepteurs LTK (*Leukocyte receptor tyrosine kinase*) et ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*)

Ces deux récepteurs sont impliqués dans les hémopathies malignes, en particulier ALK (à ne pas confondre avec les protéines ALK1 à ALK7 qui sont des sérine/thréonine kinases de la voie du TGF β , chapitre 5) qui est réarrangé dans les lymphomes anaplasiques B et dans quelques tumeurs solides. ALK est un bon candidat pour le développement de thérapies ciblées utilisant des inhibiteurs de son activité tyrosine kinase ou des approches de vaccination. Les ligands de ces récepteurs sont de petits protéoglycanes liés à l'héparane sulfate, la pléiotrophine (PTN) et la midkine (MDK).

Récepteurs ROR (*Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*)

Ces récepteurs ont longtemps été considérés comme « orphelins », c'est-à-dire sans ligand connu ; ils reconnaissent en fait les protéines WNT (chapitre 7) dont ils constituent des récepteurs annexes pour les voies non canoniques. Ils jouent un rôle dans la motilité et la polarité cellulaires, dans le développement neuronal et squelettique. ROR1 est surexprimé dans les leucémies aiguës lymphoblastiques et ROR2 est muté dans des maladies dysmorphiques héréditaires.

Récepteur ROS

Ce récepteur est le produit d'un proto-oncogène, et son ligand demeure inconnu. Des réarrangements génétiques de ROS ont été observés dans les glioblastomes et les cancers bronchiques, et une surexpression dans plusieurs types de tumeurs solides.

Récepteur PTK7

Ce récepteur est dépourvu d'activité tyrosine kinase et assurerait des fonctions d'adhésion. Il a été trouvé surexprimé dans les cancers colorectaux.

Récepteur *MUSK* (*Muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase*)

C'est un récepteur localisé au niveau des synapses neuromusculaires. Ses mutations invalidantes sont à l'origine de la myasthénie.

Récepteurs *AATK* (*Apoptosis-associated tyrosine kinase*) ou *LMR* (*de Lemur*)

Ces trois récepteurs à activité tyrosine kinase sont impliqués dans la différenciation neuronale et sont encore mal connus.

Récepteur *RYK*

Comme les récepteurs ROR, ce récepteur est impliqué dans la réception des protéines WNT (chapitre 7).

Bibliographie

- Acquaviva J, Wong R, Charest A. (2009) The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1795: 37-52.
- Beenken A, Mohammadi M. (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov*; 8: 235-53.
- Bose R, Zhang X. (2009) The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition. *Exp Cell Res*; 315: 649-58.
- Brodeur GM, Minturn JE, Ho R *et al.* (2009) Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*; 15: 3244-50.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C *et al.* (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*; 12: 541-52.
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C *et al.* (2008) The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer*; 8: 11-23.
- Ciardiello F, Tortora G. (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*; 358: 1160-74.
- Citri A, Yarden Y. (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7: 505-16.
- Ellis LM, Hicklin DJ. (2008) VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*; 8: 579-91.
- Ferguson KM. (2008) Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys*; 37: 353-73.
- Ferrara N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*; 2: 795-803.
- Green JL, Kuntz SG, Sternberg PW. (2008) Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol*; 18: 536-44.

- Harari PM, Allen GW, Bonner JA. (2007) Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol*; 25: 4057-65.
- Harper SJ, Bates DO. (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*; 8: 880-7.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ. (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*; 284: 2-13.
- Holbro T, Civenni G, Hynes NE. (2003) The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res*; 284: 99-110.
- Holbro T, Hynes NE. (2004) ErbB receptors: Directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 44: 195-217.
- Hynes NE, Lane HA. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 5: 341-54.
- Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. (2006) A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays. *Nature*; 439: 168-74.
- Jorissen RN, Walker F, Pouliot N *et al.* (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*; 284: 31-53.
- Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. (2008) Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol*; 26: 1742-51.
- Leahy DJ. (2008) A molecular view of anti-ErbB monoclonal antibody therapy. *Cancer Cell*; 13: 291-3.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. (2008) TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*; 100: 35-83.
- Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*; 19: 3159-67.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7: 359-71.
- Pollak M. (2008) Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*; 8: 915-28.
- Schlessinger J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell*; 110: 669-72.
- Schneider MR, Wolf E. (2009) The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J Cell Physiol*; 218: 460-6.
- Sequist LV, Lynch TJ. (2008) EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story. *Annu Rev Med*; 59: 429-42.
- Sorkin A, Goh LK. (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res*; 315: 683-96.
- Weiner HL, Zagzag D. (2000) Growth factor receptor tyrosine kinases: cell adhesion kinase family suggests a novel signaling mechanism in cancer. *Cancer Invest*; 18: 544-54.
- Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J *et al.* (2009) Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol Ther*; 122: 1-8.
- Wykosky J, Debinski W. (2008) The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res*; 6: 1795-806.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 127-37.
- Zhang X, Gureasko J, Shen K *et al.* (2006) An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125: 1137-49.

Chapitre 2

La voie des MAP kinases

Introduction

La voie des MAP kinases (on devrait dire *les* voies des MAP kinases) est une des principales voies de prolifération cellulaire, l'une des mieux connues, celle dont les altérations oncogéniques ont suscité le plus de travaux, celle que l'on cherche le plus à cibler sur le plan pharmacologique. Elle est située en aval de nombreux récepteurs, en particulier les récepteurs de la famille de l'EGFR, et aboutit à l'activation de facteurs de transcription, les MAP (*Mitogen-activated proteins*), qui gouvernent la transcription de nombreux gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et à la mitose. À côté de la voie classique, la mieux connue, que nous présenterons de façon détaillée, existent des voies en tous points parallèles qui sont activées par d'autres stimulus, aboutissent à l'activation d'autres facteurs de transcription et sont plus impliquées dans la réponse au stress, l'inflammation et le développement que dans la prolifération cellulaire.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les tyrosines phosphates du récepteur activé pouvaient être reconnues par de nombreuses protéines adaptatrices dotées d'un domaine de reconnaissance SH2 ou PTB. Nous partirons ici de certaines de ces protéines qui vont associer l'activation du récepteur à une protéine d'échange GTP-GDP, qui à son tour active une petite protéine G dont le rôle est capital, la protéine RAS (*Rat sarcoma*). Cette activation de RAS permettra la mise en œuvre d'une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de facteurs de transcription.

De l'activation du récepteur à l'activation de RAS

La protéine GRB2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) est une protéine adaptatrice dotée de domaines SH2 et SH3. Son domaine SH2 reconnaît des tyrosines phosphates du RTK activé (voir chapitre 1). Cela permet le recrutement à la membrane d'un facteur d'échange GTP-GDP, nommé SOS1 (*Son of sevenless homolog 1*), dont le rôle est de fixer sur la protéine RAS un GTP à la place du GDP ; c'est le rôle d'une famille de protéines que l'on appelle des GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*). Si

la voie EGFR-GRB2-SOS1-RAS est la mieux connue, il en existe de multiples variantes : d'autres protéines adaptatrices sont capables de coupler le RTK activé à la protéine RAS, en particulier, dans le cas des FGF (*Fibroblastic growth factor*), une protéine FRS (*FGF receptor substrate*) qui est phosphorylée par le récepteur, et dont les phosphotyrosines sont ensuite reconnues par la protéine GRB2. Par ailleurs, d'autres protéines d'échange GTP-GDP existent, susceptibles elles aussi d'activer la protéine RAS ; elles sont recrutées par divers types de RTK ainsi que par d'autres types de récepteurs.

Il existe trois protéines RAS homologues, K-RAS (*Kirsten RAS*), H-RAS (*Harvey RAS*) et N-RAS (*Neuroblastoma RAS*), qui se distinguent par leur spécificité tissulaire. Elles appartiennent à la famille des petites protéines G, qui fonctionnent selon le même mécanisme : un facteur d'échange GEF remplace le GDP, pour lequel elles ont une affinité importante, par du GTP. Ce remplacement induit un changement de conformation de la protéine G qui lui permet d'exercer une action en aval, par exemple, pour la protéine RAS, de se lier à une sérine/thréonine kinase RAF et de l'activer. Les petites protéines G possèdent une activité GTPasique qui leur permet ensuite d'éliminer le phosphate en gamma du nucléotide et de revenir à leur forme première, liée au GDP. Cette activité GTPasique est stimulée par un facteur activateur GAP (*GTPase-activating protein*).

Il existe une grande variété de petites protéines G et des modulateurs de leur activité, GEF et GAP. Dans le cas des protéines RAS et en réponse à l'activation d'un RTK, le GEF est donc la protéine SOS1 et le GAP une protéine nommée RASGAP. Un autre GEF de RAS, nommé RASGRP (*RAS guanyl nucleotide releasing protein*), peut être activé par les seconds messagers, l'IP3 (Inositol triphosphate), *via* le Ca^{2+} qu'il mobilise, et le DAG (Diacylglycérol), libérés du phosphatidylinositol par la phospholipase C gamma ($\text{PLC}\gamma$), cette dernière possédant un domaine SH2 permettant son activation par un RTK (voir chapitre 1). Signalons enfin que ce GEF peut être activé par une autre voie de signalisation, celle impliquant des récepteurs à sept domaines transmembranaires (GPCR, pour *G protein-coupled receptor*) couplés à des protéines G hétérotrimériques activant une phospholipase C bêta ($\text{PLC}\beta$) à l'origine elle aussi des seconds messagers que sont l'IP3 et le DAG (voir chapitre 6).

Les protéines RAS sont ancrées dans la membrane plasmique des cellules par l'intermédiaire d'une liaison covalente, ajoutée de façon post-traductionnelle au niveau du réticulum endoplasmique, avec un groupement hydrophobe ramifié dit groupement prényl, qui peut compter quinze atomes de carbone (farnésyl) ou vingt atomes de carbone (géranylgeranyl). Ces deux groupements sont des intermédiaires de la voie de biosynthèse du cholestérol. Cet ancrage se fait par l'intermédiaire d'une cystéine de la chaîne polypeptidique, au niveau d'un motif -CAAX (C pour cystéine, A pour tout acide aminé aliphatique, X pour tout acide aminé) dont les trois acides aminés AAX sont éliminés après prénylation (fig. 2-1). Il se produit en outre, dans l'appareil de Golgi, une palmitoylation (liaison avec un acide gras linéaire saturé à seize atomes de carbone, l'acide palmitique, Annexe C) de certaines protéines RAS au niveau d'une cystéine située un peu en amont de celle recevant la prénylation. On considère que c'est le recrutement à la membrane de SOS1, grâce à son affinité pour GRB2, qui

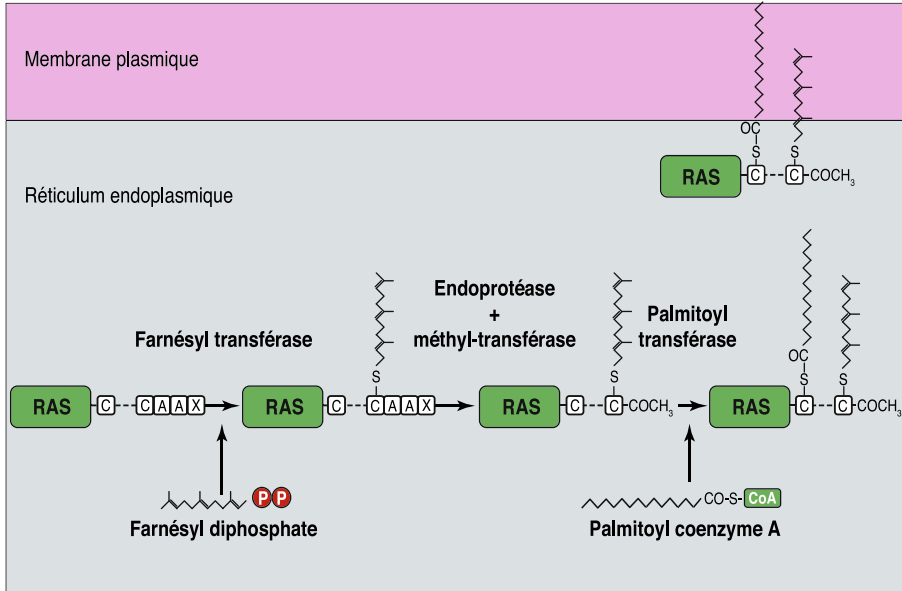


Fig. 2-1 – Les modifications post-traductionnelles de RAS.

Les protéines RAS subissent, au niveau du réticulum endoplasmique, la fixation d'un groupe-ment prényl (farnésyl ou géranylgeranyl) sur une cystéine au niveau d'une séquence -CAAX. Les acides aminés AAX sont ensuite éliminés et remplacés par un groupement acétyle en C-terminal. Ultérieurement, un acide palmitique est ajouté au niveau d'une cystéine située quelques acides aminés en amont de la cystéine prénylée. C'est une protéine RAS ayant subi ces deux modifications post-traductionnelles qui peut s'insérer dans la membrane plasmique.

permet la rencontre de la protéine d'échange avec son substrat, et donc l'activation de RAS. Cet ancrage membranaire est indispensable à la fonction des protéines RAS.

Lorsqu'il est lié au GTP, RAS subit une modification conformationnelle qui lui permet de reconnaître et de recruter à la membrane une sérine/thréonine kinase qui est une protéine RAF dans la voie des MAP kinases. Plusieurs autres sérine/thréonine kinases peuvent ainsi être activées par RAS, comme la PI3 kinase que nous retrouverons au chapitre 3, ainsi que d'autres enzymes comme la phospholipase C epsilon (PLCε) ou d'autres petites protéines G comme RAL. Les protéines RAS sont ainsi un carrefour important au cœur de plusieurs voies de signalisation. L'activation des protéines en aval de RAS est un phénomène limité dans le temps, puisque l'activité GTPasique de RAS, aidée en cela par la protéine RASGAP, désactive rapidement RAS en le ramenant à la forme RAS-GDP inactive, incapable de reconnaître et d'attirer RAF à la membrane plasmique. La protéine RASGAP possède un domaine SH2 qui lui permet, comme GRB2, d'être recrutée à la membrane par un récepteur RTK afin d'y exercer son action. La figure 2-2 présente les étapes successives de la voie des MAP kinases.

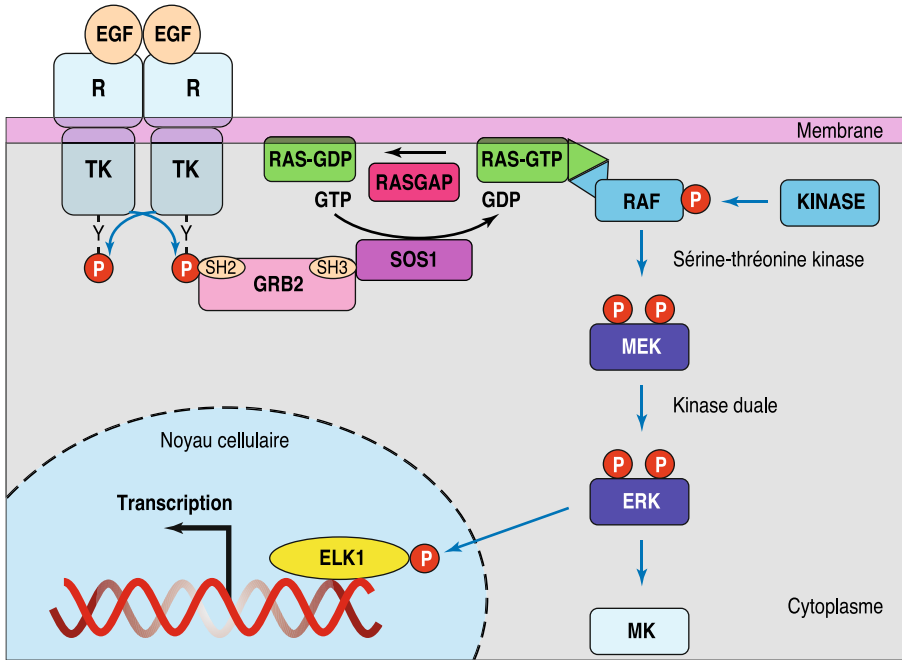


Fig. 2-2 – La voie des MAP kinases.

Selon la voie de signalisation la plus classique, l'activation d'un RTK permet le recrutement d'une protéine à domaine SH2 appelée GRB2 ; le domaine SH3 de GRB2 est reconnu par une protéine SOS1, qui est un facteur d'échange GDP-GTP pour les protéines RAS. RAS-GTP peut recruter à la membrane une protéine RAF, qui reçoit alors une ou plusieurs phosphorylations catalysées par d'autres kinases (PKA, PAK, SRC), ce qui active sa fonction de kinase. RAS-GTP est désactivé par son activité GTPasique propre, stimulée par la protéine RASGAP (*RAS GTPase-activating protein*). RAF phosphoryle et active une protéine MEK, qui phosphoryle et active une protéine ERK, qui phosphoryle et active un facteur de transcription comme ELK1 ou une kinase de la famille MK.

La cascade des kinases

La cible directe de RAS dans la voie des MAP kinases est une sérine/thréonine kinase appelée RAF. Il existe en fait trois protéines RAF, nommées A-RAF, B-RAF et C-RAF (ou RAF1). Leur liaison avec RAS-GTP entraîne un changement de conformation des protéines RAF, qui dévoile une boucle d'activation les rendant aptes à être phosphorylées et activées. Le processus d'activation des protéines RAF est complexe et encore imparfaitement élucidé ; il fait intervenir une dimérisation particulière des protéines RAF et leur phosphorylation par des kinases comme la protéine kinase A activée par l'AMP cyclique, mise en jeu à la suite de l'activation d'un GPCR (*G protein-coupled receptor*) (chapitre 6), la kinase cytoplasmique SRC, mise en jeu à la suite de l'activation de nombreux stimulus, la kinase JAK mise en jeu après action de cytokines

(chapitre 4), ou encore la kinase PAK1 (*p21-activated kinase 1*) mise en jeu après activation de la voie des sémaphorines (chapitre 10) ou des intégrines (chapitre 11).

Plusieurs phosphorylations de RAF doivent être mises en œuvre. Deux d'entre elles siègent, du côté N-terminal, sur un motif SSYY où la première sérine et la deuxième tyrosine doivent être phosphorylées ; toutefois, pour B-RAF, la première sérine est phosphorylée de façon constitutive et les deux tyrosines sont remplacées par des acides aspartiques, dont la charge négative est constitutivement « phosphomimétique ». Deux autres phosphorylations siègent au niveau du domaine kinase C-terminal, sur une thréonine et une sérine (T599 et S602 pour B-RAF). Alors qu'A-RAF et C-RAF nécessitent quatre phosphorylations pour être actives, B-RAF n'en requiert que deux ; nous en verrons plus loin les conséquences pour l'oncogénèse.

En aval des kinases RAF se situent les kinases MEK1 et MEK2, et en aval de MEK1/2 se situent les kinases ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal-regulated kinase*). On a ainsi un système à trois niveaux de phosphorylation ; les kinases RAF sont aussi appelées des MAP3K ou MAPKKK, les kinases MEK des MAP2K ou MAPKK, et les kinases ERK les MAP kinases proprement dites (MAPK). Nous verrons plus loin que ce « module » RAF-MEK-ERK n'est qu'un module parmi d'autres et qu'il existe des voies parallèles à trois niveaux successifs de phosphorylation, plutôt impliquées dans la réponse au stress et dans l'inflammation que dans la prolifération cellulaire. On a identifié au total vingt et une MAP3K, sept MAP2K et dix MAPK.

L'activation de MEK se fait par phosphorylation de deux sérines proches l'une de l'autre, au niveau de la boucle d'activation du site catalytique. La kinase la plus active sur MEK est B-RAF, suivie de C-RAF, alors qu'A-RAF a une activité plus faible. À son tour, MEK est capable de phosphoryler ERK, qui est son seul substrat ; MEK est une kinase duale capable de phosphoryler à la fois une thréonine et une tyrosine d'ERK, également au niveau de la boucle d'activation, et disposées de la façon suivante : TEY (thr-glu-tyr). La spécificité de l'action des kinases de chaque niveau sur la kinase de niveau inférieur provient davantage des interactions différentes entre domaines de reconnaissance protéine-protéine que de l'action catalytique elle-même.

Les trois étages successifs des kinases ne sont pas dispersés dans le cytoplasme : il existe des protéines d'échafaudage (*Scaffold proteins*) chargées de maintenir en un complexe associatif les trois kinases agissant séquentiellement. Dans le cas de la voie RAS-RAF-MEK-ERK, la protéine d'échafaudage se nomme KSR (*Kinase suppressor of RAS 1*) et intervient au niveau de la membrane plasmique (fig. 2-3) ; d'autres protéines d'échafaudage interviennent dans l'activité de ce module au niveau des endosomes, de l'appareil de Golgi ou des plaques d'adhésion focale. En effet, à côté de la voie classique où RAS intervient au niveau de la membrane plasmique, il existe des systèmes d'activation de RAS intracytoplasmiques, à distance de la membrane plasmique, qui sont suivis de la cascade des trois étages de kinases. Celle de l'appareil de Golgi est mise en jeu par la protéine d'échange RASGRP1, activée par les seconds messagers produits par les PLC β et γ , comme nous l'avons mentionné plus haut.

Enfin, des régulateurs négatifs de la voie des MAP kinases sont les phosphatases duales, au nombre de dix, que l'on appelle MKP (*MAP kinase phosphatases*) ou DUSP (*Dual specificity phosphatases*). Elles exercent leur activité au niveau de thréonines comme de tyrosines phosphatées, avec une spécificité de substrat variable.

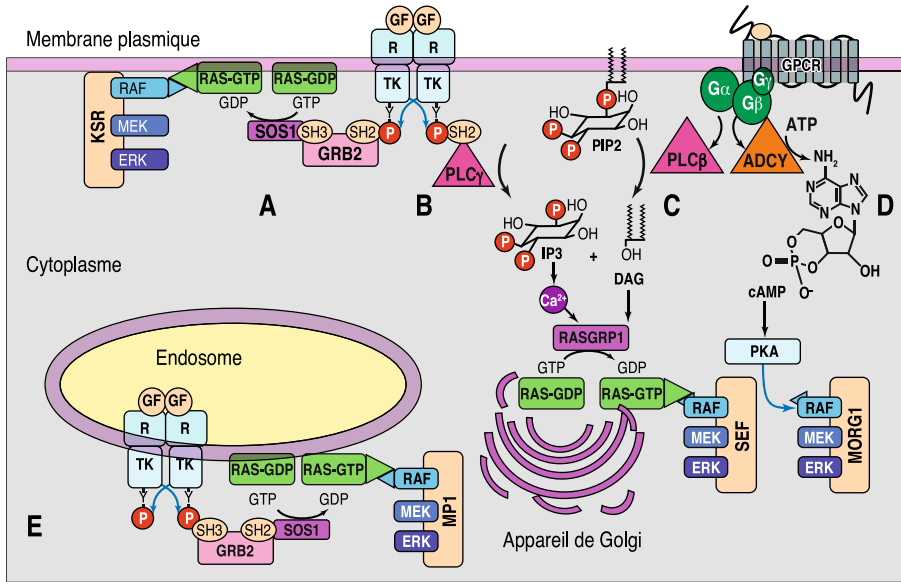


Fig. 2-3 – L'organisation des kinases à l'aide de protéines d'échafaudage.

Les trois étages des MAP kinases ne sont pas dispersés dans le cytoplasme, mais assemblés grâce à des protéines d'échafaudage. Les signaux apportés par un facteur de croissance GF à un récepteur à tyrosine kinase RTK activent la voie RAS-RAF-MEK-ERK au niveau de la membrane plasmique grâce à la protéine d'échafaudage KSR1 (A) ; ils peuvent activer la PLCγ qui conduit, par l'intermédiaire des seconds messagers IP3 et DAG, à l'activation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK dans l'appareil de Golgi grâce à la protéine d'échafaudage SEF (B). Les signaux activant un GPCR (*G protein-coupled receptor*) peuvent activer la voie RAS-RAF-MEK-ERK soit par la voie des seconds messagers IP3, DAG et Ca²⁺, produits par une PLCβ (C), soit par la voie de l'AMP cyclique et de la protéine kinase A, grâce à la protéine d'échafaudage MORF1 (*MAPK organizer 1*) (D). Enfin, l'activation d'un RTK au niveau d'un endosome conduit à une activation classique de RAS puis à une séquence RAF-MEK-ERK grâce à une protéine d'échafaudage MP1 (E). D'autres systèmes existent, impliquant les mêmes kinases RAF-MEK-ERK et d'autres protéines d'échafaudage comme la β-arrestine ou la paxilline.

Les autres modules de signalisation

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il existe plusieurs modules de signalisation en aval de protéines du type de RAS et mettant en jeu successivement trois étages de phosphorylation avec des MAP3K, MAP2K et MAPK et des protéines d'échafaudage distinctes. Sans pouvoir les décrire toutes, et sans entrer dans le détail des combinaisons possibles entre les trois étages de phosphorylation, nous mentionnerons la voie de la p38, la voie de la JUN N-terminal kinase (JNK) et la voie ERK5. La figure 2-4 résume ces voies de signalisation parallèles à la voie RAF-MEK-ERK. Il est important de noter que leurs effets vont plus souvent dans le sens de la différenciation ou de l'apoptose que dans le sens de la prolifération cellulaire, ce qui montre combien il

est difficile d'attribuer une fonction unique à une voie de signalisation : le « contexte cellulaire », c'est-à-dire les conditions dans lesquelles vont s'exercer ces effets, joue un rôle primordial.

Les JUN N-terminal kinases, JNK ou SAPK (*Stress-activated protein kinase*), au nombre de trois, sont activées en réponse à des cytokines pro-inflammatoires, à des stress comme la chaleur, les radiations ionisantes, l'endommagement de l'ADN ou le stress oxydatif, et accessoirement par les facteurs de croissance. Le TNF (*Tumor necrosis factor*) et les ligands WNT activent également cette voie de signalisation (voir chapitres 18 et 7). Les JUN kinases phosphorylent des facteurs de transcription comme JUN, MYC et ELK1, qui à leur tour contrôlent l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Elles sont phosphorylées sur une séquence TPY par MEK4 et MEK7, elles-mêmes phosphorylées par diverses MAP3K (fig. 2-4).

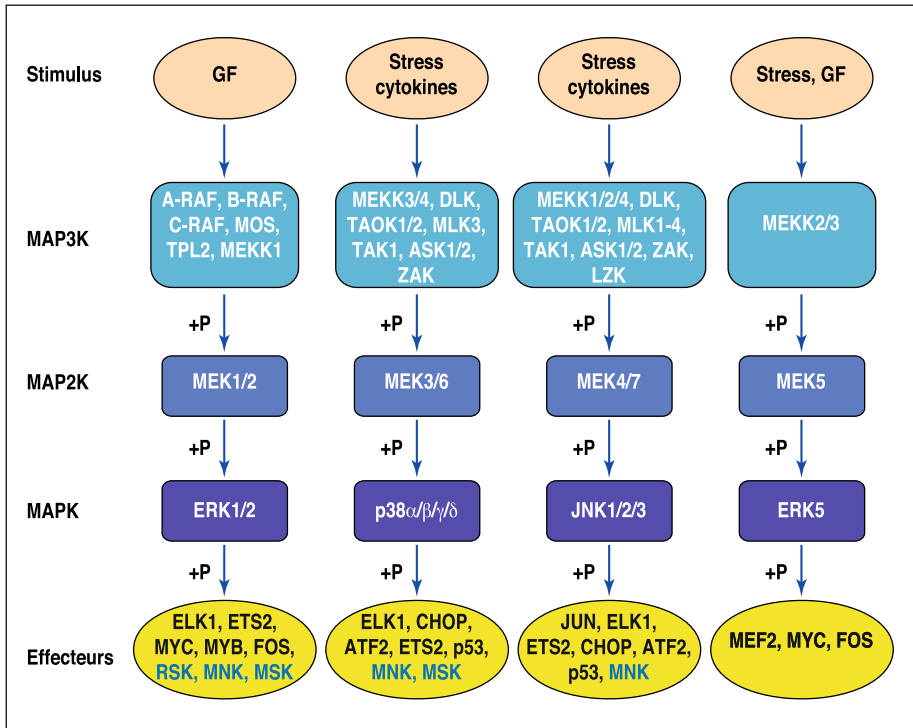


Fig. 2-4 – Les différents modules des cascades de kinases.

Cinq systèmes de kinases à plusieurs étages ont été identifiés ; tous partent d'un stimulus (facteur de croissance, cytokine, stress) qui active une MAP3K, qui phosphoryle et active une MAP2K, qui phosphoryle et active une MAPK, qui phosphoryle et active un effecteur (facteur de transcription, autre kinase, etc.). Notons que le stimulus initial peut provenir d'une petite protéine G comme RAS accompagné d'une phosphorylation par une kinase de quatrième niveau (MAP4K). De gauche à droite, la voie classique des MAP kinases, la voie de la p38, la voie de la JUN N-terminal kinase, la voie d'ERK5.

Les kinases p38, au nombre de quatre (p38 α , β , γ et δ ou MAPK11 à MAPK14) sont elles aussi activées en réponse au stress (radiations UV, choc osmotique, hypoxie, cytokines pro-inflammatoires) plus qu'en réponse aux facteurs de croissance. Elles phosphorylent également un panel de facteurs de transcription et de kinases MK dont beaucoup sont communs aux voies ERK1/2 et JNK1/2/3. Elles sont préférentiellement activées par phosphorylation sur une séquence TGY par MEK3 et MEK6, elles-mêmes phosphorylées par diverses MAP3K. Elles exercent un effet négatif sur la prolifération cellulaire et un effet positif sur l'apoptose ; leur rôle semble être, en définitive, d'empêcher les cellules ayant subi un stress de s'engager dans le cycle cellulaire. Toutefois, elles ont également un rôle positif sur la motilité cellulaire.

Rappelons que pour chacun de ces modules existent des protéines d'échafaudage différentes, des phosphatases de spécificité variable et des protéines de régulation diverses : la complexité de la « redistribution de l'information » à travers la voie des MAP kinases est extrême et explique l'aspect pléiotropique de leurs actions. L'activation de ces voies se fait généralement par une petite protéine G, dont l'archétype est RAS, et dont le rôle est de recruter la première kinase de la cascade pour être phosphorylée. Il existe d'autres systèmes d'activation, mettant en jeu des kinases de quatrième niveau (MAP4K) qui sont activées en réponse à divers signaux.

Les substrats des MAP kinases

Les MAP kinases ont la propriété de phosphoryler et d'activer de nombreux facteurs de transcription, comme ELK1, ETS, FOS, JUN, MYC et SP1, qui induisent l'expression de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la prolifération ; la plupart étaient connus comme proto-oncogènes. Les MAP kinases sont également capables de phosphoryler une famille d'une dizaine de kinases aux propriétés biologiques diverses, appelées MK (*MAPK-activated protein kinases*), comprenant des RSK (*Ribosome S6 kinases*), des MSK (*Mitogen and stress-activated kinases*) et des MNK (*MAP kinase interacting proteins*). Ces kinases exercent des effets divers dans la cellule, surtout au niveau de la prolifération et de l'adhésion cellulaires.

Les facteurs de transcription activés par les MAP kinases

La famille MYC

Les facteurs de transcription de cette famille sont caractérisés par un motif HLH (hélice-boucle-hélice, Annexe B) qui permet leur dimérisation avec un partenaire commun, MAX (*MYC-associated factor X*). Leur activation est contrôlée avec précision et leur demi-vie est brève ; MAX est en revanche stable, ubiquitaire et exprimé en permanence. Les homodimères MAX-MAX n'ont pas d'activité transcriptionnelle, et seuls les hétérodimères sont actifs. Les protéines susceptibles de se lier avec MAX appartiennent à plusieurs groupes : le groupe MYC, identifié à l'origine à partir des oncogènes *c-myc*, *N-myc* et *L-myc* (nommés d'après le virus de la myélocytomatose

aviaire), et contenant les protéines MYC, MYCL et MYCN, le groupe MAD ou MXD (*MAX dimerisation protein*), et les protéines MNT (*MAX interacting protein*) et MGA (*MAX gene associated*).

Les complexes MYC-MAX sont des activateurs transcriptionnels se fixant sur des séquences promotrices contenant l'hexanucléotide CACGTG de la « boîte E » et recrutant les histones acétyltransférases nécessaires à la relaxation de la chromatine (voir Annexe B). Ils sont également capables de réprimer la transcription d'autres gènes en se fixant sur un élément initiateur (INR) d'autres promoteurs. Les gènes dont la transcription est activée par MYC sont nombreux ; on y trouve des gènes impliqués dans la croissance, la prolifération et l'avancement du cycle cellulaire : cyclines, CDK, CDC25 (voir chapitre 17), télomérase, facteurs d'initiation de la traduction ; parmi les gènes dont la transcription est réprimée, on trouve au contraire des régulateurs négatifs du cycle cellulaire : p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p15^{INK4b}, ainsi que le gène de la protéine p53. Il faut noter que MYC est, paradoxalement, capable d'induire l'apoptose *via* l'activation de BAX (chapitre 18).

En revanche, les complexes MAD-MAX sont des répresseurs transcriptionnels au niveau des mêmes sites promoteurs. Cette répression fait intervenir le corépresseur SIN3 (*Silencing homolog 3*), qui fait partie du complexe de l'histone désacétylase. L'activité de MAD entraîne un blocage de la prolifération cellulaire et une inhibition de la transformation, ainsi qu'une induction de la différenciation dans de nombreux tissus.

La famille FOS-JUN

Les facteurs de transcription JUN et FOS (nommés d'après les noms des oncogènes correspondants) appartiennent à une famille appelée AP1 (*Activator protein 1*) associée à la prolifération et à la différenciation cellulaires. Ils fonctionnent après dimérisation. Il existe trois protéines JUN (JUN ou c-JUN, JUNB et JUND) et quatre protéines FOS (FOS ou c-FOS, FOSB, FRA1 et FRA2). Les protéines JUN peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec les protéines FOS, mais les protéines FOS ne peuvent que s'hétérodimériser avec des protéines JUN. Une hétérodimérisation avec des facteurs de transcription des familles MAF (de l'oncogène viral *musculo-aponeurotic fibrosarcoma*) et ATF (*Activating transcription factor*) est également possible. Les MAP kinases ERK, ainsi que les kinases des modules JNK et p38, sont capables de phosphoryler et d'activer les éléments des complexes AP1. D'autres phosphorylations sont possibles : par exemple, JUNB peut être phosphorylé par le complexe CDK1-cycline B d'entrée en mitose (chapitre 17), ce qui le conduit à la protéolyse.

Les différents dimères pouvant exister ont des rôles physiologiques opposés : c'est ainsi que le dimère JUN-FOS induit la transcription de gènes de prolifération, comme celui de la cycline D et du CDK4/6, alors que les dimères JUN-JUNB ou JUN-JUND en sont incapables : JUNB et JUND apparaissent ainsi comme des inhibiteurs de JUN. Ils induisent en revanche la transcription des régulateurs négatifs du cycle cellulaire. On comprend ainsi pourquoi les différents modules de MAP kinases, qui phospho-

rylent de façon différentielle les divers éléments des complexes AP1, peuvent avoir des effets opposés sur la prolifération et la différenciation cellulaires. Parmi les gènes cibles des complexes AP1 figurent également les gènes de cytokines et de facteurs de croissance (chapitre 4), de FASL et du TNF (chapitre 18).

La famille ETS

Cette famille comprend une série de facteurs de transcription, parmi lesquels ETS1, ETS2, ELK1, SAP1, SAP2, ERF, NET ou ELK3. Ils s'associent à d'autres facteurs de transcription pour former des dimères fonctionnels. Un premier groupe (ETS1 et 2) s'associe aux éléments de la famille AP1 ; le groupe comprenant ELK1 et SAP1 et 2 (appelé collectivement TCF [*T-cell factor*]) s'associe aux facteurs de transcription de la famille SRF (*Serum responsive element-binding transcription factor*) pour activer des sites SRE (*Serum responsive element*). Un troisième groupe est exclusivement répresseur de la transcription.

Les facteurs ETS-ELK ont pour gènes cibles ceux codant pour d'autres facteurs de transcription (MYC, FOS), pour des protéines de régulation du cycle cellulaire (cycline D1, p53, p21^{CIP1}), pour des protéines anti-apoptotiques (BCL2), pour des cytokines, pour des facteurs de croissance, etc.

Les kinases MK activées par les MAP kinases

Les quatre kinases RSK sont phosphorylées et activées par ERK1/2, ainsi que par la kinase PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) (chapitre 3) ; elles jouent un rôle dans la survie et la prolifération cellulaires, phosphorylant de nombreux substrats comme FOS et JUN (voir ci-dessus), les protéines p27^{KIP1} et MYT1 (chapitre 17), IκBα (chapitre 12), BAD (chapitre 18), LKB1 (chapitre 3) et SOS1 (chapitre 1). Malgré leur nom, la protéine ribosomale S6 n'est qu'un substrat accessoire par rapport à leur activation par la voie MTOR (chapitre 3).

Les kinases MSK, phosphorylées et activées par les kinases ERK1/2 et p38, sont surtout impliquées dans la régulation transcriptionnelle, avec comme substrat des histones et des facteurs de transcription (CREB, ATF, NFκB). Les kinases MNK, également activées dans les voies ERK1/2 et p38, sont surtout impliquées dans le contrôle de la traduction avec comme substrats des facteurs d'élongation de la synthèse protéique. Enfin, deux kinases MK sont impliquées dans la stabilité de l'ARN et l'organisation du cytosquelette d'actine *via* des phosphorylations spécifiques.

Altérations oncogéniques

La voie des MAP kinases est une des grandes voies de l'oncogenèse et plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs y ont été identifiés depuis longtemps. Si la protéine adaptatrice GRB2 et le facteur d'échange GDP-GTP ne semblent pas subir de mutations oncogéniques, il n'en est pas de même pour la protéine RAS dont les

trois isoformes K-RAS, H-RAS et N-RAS sont mutées dans de nombreux cancers. Par exemple, K-RAS est muté dans environ 40 % des cancers colorectaux, 20 % des cancers du poumon non à petites cellules, 90 % des cancers du pancréas et 5 % des cancers du sein. C'est une des protéines les plus fréquemment mutées dans les cancers humains. Les mutations activatrices siègent principalement au niveau des codons 12 et 13 et remplacent deux glycines par d'autres acides aminés. La protéine mutée conserve ses propriétés de se lier au GDP, de permettre l'échange GDP-GTP, de reconnaître et de recruter à la membrane une protéine RAF ; mais elle devient incapable de remplir sa fonction enzymatique intrinsèque qui est de cliver le GTP en GDP : elle reste donc active en permanence pour transmettre un ordre de prolifération. On dit souvent que cette mutation « transforme un fusil à un coup en une mitrailleuse ». Des mutations, plus rares, au niveau du codon 61, entravent la stimulation de l'activité GTPasique par le facteur GAP ; les conséquences en sont les mêmes, l'activité enzymatique intrinsèque de RAS paraissant insuffisante pour une désactivation rapide.

Pour les mêmes raisons, des mutations désactivatrices du système de stimulation de l'activité GTPasique de RAS auront un effet oncogénique et les facteurs GAP ou les facteurs qui leur sont associés comme la protéine NF1 (*Neurofibromatosis 1*) sont des suppresseurs de tumeurs ; l'altération germinale de NF1 est responsable de la neurofibromatose et s'accompagne d'une prédisposition aux cancers.

La protéine RAF constitue également un point d'appel pour l'oncogénèse. Une mutation activatrice est principalement rencontrée : la mutation V600E de la protéine B-RAF. En effet, on ne connaît pas de mutations activatrices d'A-RAF et exceptionnellement de C-RAF. Cela est dû au fait que plusieurs mutations seraient nécessaires sur ces deux protéines pour les activer, alors que B-RAF, déjà « préparé » au niveau des sites de phosphorylation N-terminaux, n'a besoin que de l'introduction d'une charge négative à proximité des acides aminés 599-602 pour mimer la présence d'un groupement phosphate. La mutation V600E, qui introduit un acide glutamique à proximité des sites de phosphorylation du domaine catalytique, remplit cet office. Ces mutations sont rencontrées dans les mélanomes et les cancers thyroïdiens principalement, mais aussi dans d'autres cancers comme les cancers de l'ovaire et du côlon.

Les protéines MEK et ERK, en revanche, ne subissent pas de mutations activatrices récurrentes ; elles sont souvent surexprimées dans les cancers et apportent par là, vraisemblablement, une contribution significative à l'oncogénèse. On évalue souvent leur degré d'activation par les événements oncogéniques en amont par leur degré de phosphorylation, grâce à la disponibilité d'anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de ces protéines. Les MAPK et MAP2K des autres modules peuvent, à l'opposé, se comporter comme des suppresseurs de tumeurs : on connaît des mutations invalidantes de MEK4 dans des cancers variés, quoique à une fréquence faible (pancréas, sein, poumon, côlon, etc.) Il existe une diminution de l'expression de cette protéine dans 75 % des cancers de l'ovaire.

Les voies des p38 et des JUNK se comportent le plus souvent, à l'inverse de la voie ERK, comme des suppresseurs de tumeurs ; ce sont les altérations invalidantes des kinases de ces voies, comme MEK4 et MEK6, qui pourraient être impliquées dans l'oncogénèse. Le niveau d'activité des kinases p38 et MEK6 est très faible dans les

carcinomes hépatocellulaires et des mutations « perte de fonction » de MEK4 ont été décrites dans des tumeurs humaines. Toutefois, une augmentation du niveau de phosphorylation de p38 α a été corrélée à une malignité accrue de divers cancers, peut-être en raison du rôle de la voie p38 dans la régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 (chapitre 4) ou l'IL1 (chapitre 12). En outre, la voie JNK et la voie p38 stimulent l'angiogenèse et l'invasivité tumorale en raison de leur activité stimulatrice de la motilité cellulaire et de la production des métalloprotéinases. L'un des effecteurs principaux de la voie JNK, le facteur de transcription JUN, qui participe au complexe AP1, est clairement oncogénique.

Enfin, les facteurs de transcription (les MAP) sont également des proto-oncogènes importants à l'extrémité de cette voie de signalisation. Parmi les facteurs de transcription phosphorylés et activés par les MAP figurent la protéine MYC, la protéine MYB, les protéines JUN et FOS et bien d'autres connues pour leur rôle oncogénique. Le point de départ de l'oncogenèse liée à ces facteurs de transcription est à rechercher au niveau de leur surexpression : la quantité de protéine disponible pour se lier à MAX dans le cas de MYC ou à FOS dans le cas de JUN. À l'inverse, les protéines MAD apparaissent comme des suppresseurs de tumeurs. Une amplification de *MYC* est présente dans plusieurs types tumoraux, et l'amplification de *MYCN* sont un facteur de mauvais pronostic des neuroblastomes de l'enfant.

Cibles pharmacologiques

Tous les étages de cette voie de signalisation ont été explorés sur le plan pharmacologique afin de découvrir des molécules susceptibles de l'inhiber et d'avoir ainsi des propriétés antiprolifératives utilisables dans le traitement des cancers.

Les protéines adaptatrices dotées de domaines SH2 pourraient théoriquement être inhibées par des composés mimant les interactions protéine-protéine. Cette approche intéressante se heurte au fait que les peptides, s'ils sont bien manipulables *in vitro*, entrent difficilement dans la cellule et se prêtent mal à un développement pharmacologique.

Les protéines RAS ont fait l'objet de recherches intenses, principalement orientées vers l'inhibition de leur insertion membranaire. Des molécules pourvues d'activités inhibitrices de la farnésyl transférase ou de la géranylgeranyl transférase ont été découvertes, développées et ont fait l'objet d'essais cliniques approfondis. Quatre classes d'inhibiteurs ont été développées : les analogues du farnésyl diphosphate, substrat de la farnésyl transférase, les peptidomimétiques de la boîte CAAX, les inhibiteurs bisubstrats et les produits naturels obtenus par criblage. Lors de l'expérimentation préclinique, plusieurs composés se sont révélés très actifs. Quatre composés sont entrés en développement clinique, dont le tipifarnib et le lonafarnib. Malheureusement, ces molécules se sont révélées décevantes sur le plan de leur activité clinique et sur le plan de leur toxicité. Il semble que ce soit lié au fait qu'elles sont beaucoup plus actives sur d'autres petites protéines G comme les protéines RHO, impliquées dans d'autres voies de signalisation, en particulier au niveau du cytosquelette, que sur les protéines RAS elles-mêmes. À l'heure actuelle, des essais sont pour-

suivis en association avec une chimiothérapie classique ou avec la radiothérapie, car ces molécules ont montré des propriétés radiosensibilisantes.

Il est à noter que les mutations activatrices de RAS découplent la voie des MAP kinases de l'activation du RTK, permettant ainsi aux cellules tumorales ayant cette altération oncogénique d'acquérir une autosuffisance en facteurs de croissance qui constitue une des principales familles de mécanismes oncogéniques. Il a été montré que, de façon quasi absolue, les mutations activatrices de RAS s'accompagnent effectivement d'une inefficacité des anticorps anti-EGFR dans les cancers colorectaux (chapitre 1).

Les protéines de la cascade des kinases ont fait également l'objet de recherches d'inhibiteurs. Un inhibiteur de RAF a été identifié par criblage de banques de molécules (chimiothèques) : ce composé, le sorafénib, s'est révélé être également un inhibiteur puissant des récepteurs du VEGF (KDR) (voir chapitre 1). Son activité est due à une inhibition de l'activité kinase de RAF par compétition avec son substrat, l'ATP. Actuellement sur le marché pour le traitement des carcinomes rénaux et des hépatocarcinomes, le sorafénib apparaît être plus un inhibiteur de l'angiogenèse qu'un inhibiteur de la prolifération cellulaire au niveau de sa cible originale RAF. D'autres inhibiteurs de RAF sont à l'étude ; il est à noter qu'ils ne sont actifs qu'en cas de mutation de B-RAF, et seraient au contraire des activateurs de la voie des MAP kinases dans les tumeurs ne présentant pas de mutation activatrice de K-RAS ni de B-RAF. La question se pose de savoir s'il vaut mieux développer des inhibiteurs spécifiques de la kinase B-RAF mutée ou au contraire des inhibiteurs pan-RAF.

Plusieurs inhibiteurs de MEK sont à l'heure actuelle en cours d'évaluation dans des essais cliniques de phase I et II. Le fait qu'ERK1 et ERK2 sont les seuls substrats de MEK1 et MEK2 encourage ce développement, car il augure d'une bonne spécificité des inhibiteurs. Les composés à l'étude dérivent du CI-1040, très utilisé expérimentalement mais inutilisable en clinique, qui est un inhibiteur allostérique de l'activité kinase : il induit un changement de conformation empêchant l'accès du site catalytique par l'ATP.

L'inhibition des voies JNK et p38 a été développée dans le traitement de l'inflammation, et les molécules disponibles ne semblent pas avoir d'effets anticancéreux directs. Toutefois, dans la mesure où l'inflammation chronique est un facteur de stimulation de la progression tumorale, des inhibiteurs de ces kinases ont été testés en oncologie. Par ailleurs, ces composés peuvent interférer avec le rôle pro-angiogénique des voies JNK et p38 et méritent certainement une grande attention.

Enfin, même si les divers facteurs de transcription qui représentent l'aboutissement de la voie des MAP kinases constituent autant de cibles potentielles, le développement pharmacologique d'inhibiteurs est encore préliminaire. Des peptidomimétiques ciblant les interactions protéine – protéine au niveau de MYC-MAX ou de JUN-FOS, par exemple, pourraient se révéler intéressants pour le traitement des cancers.

Bibliographie

- Boutros T, Chevet E, Metrakos P. (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*; 60: 261-310.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT *et al.* (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*; 17: 1263-93.
- Dhanasekaran DN, Kashef K, Lee CM, Xu H, Reddy EP. (2007) Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*; 26: 3185-202.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*; 26: 3279-90.
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 16: 653-99.
- Karnoub AE, Weinberg RA. (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9: 517-31.
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. (2007) Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov*; 6: 541-55.
- Leicht DT, Balan V, Kaplun A *et al.* (2007) Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta*; 1773: 1196-212.
- McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL *et al.* (2008) Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia*; 22: 708-22.
- McKay MM, Morrison DK. (2007) Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*; 26: 3113-21.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, Peeper DS. (2008) BRAF (E600) in benign and malignant human tumours. *Oncogene*; 27: 877-95.
- Owens DM, Keyse SM. (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*; 26: 3203-13.
- Roberts PJ, Der CJ. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*; 26: 3291-310.
- Roux PP, Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*; 68: 320-44.
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. (2007) Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*; 7: 295-308.
- Sebolt-Leopold JS, Herrera R. (2004) Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer*; 4: 937-47.
- Steelman LS, Abrams SL, Whelan J *et al.* (2007) Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 2008; 22: 686-707.
- Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*; 26: 3240-53.

Chapitre 3

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase

Introduction

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est une des voies de signalisation qui s'ouvre en aval de l'interaction d'un facteur de croissance avec un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Elle suit donc un chemin parallèle à la voie des MAP kinases. Comme cette dernière, elle est mise en œuvre à la suite de la reconnaissance d'une phosphotyrosine du récepteur activé par une protéine adaptatrice et comporte des activations séquentielles de kinases aboutissant à des effets multiples sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires.

Cette voie est interconnectée en particulier avec la voie des MAP kinases au niveau de RAS ; elle est en outre capable d'intégrer des signaux métaboliques et nutritionnels qui servent à associer la croissance et la prolifération cellulaires à la disponibilité en nutriments. C'est une des voies majeures de l'action de l'insuline, dont nous avons vu (chapitre 1) qu'elle pouvait être considérée comme un facteur de croissance. Cette voie connaît de multiples altérations contribuant à l'oncogenèse et pour cette raison comporte de nombreuses cibles potentielles pour un développement thérapeutique.

De la phosphatidylinositol-3-kinase aux protéines AKT

La principale phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase) est un hétérodimère composé de deux sous-unités, une sous-unité catalytique (p110, PIK3CA) portant une activité de lipide kinase, et une sous-unité régulatrice (p85, PIK3R1) dotée d'un domaine SH2 qui lui permet de reconnaître des phosphotyrosines de RTK activés, et de transmettre cette activation à la sous-unité catalytique. Indirectement, l'activation de p85 peut se faire par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice, IRS1 ou 2 (*Insulin receptor substrate 1 or 2*), phosphorylée elle-même par certains récepteurs activés comme l'IGF1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*), et reconnue par un domaine SH2 de p85 (fig. 3-1)

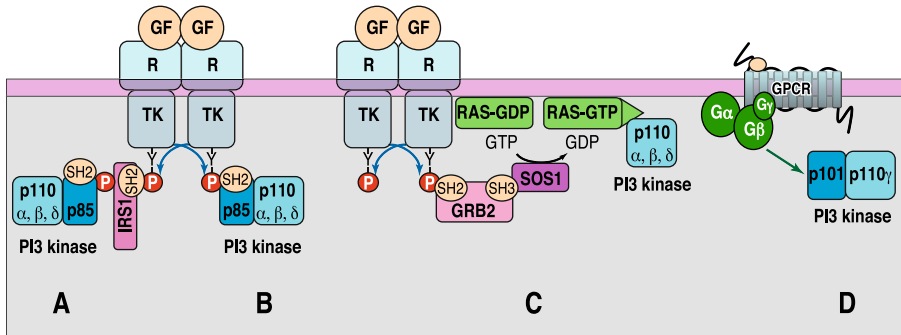


Fig. 3-1 – Activation de la PI3 kinase par différentes voies.

La PI3 kinase est susceptible d'être activée par reconnaissance d'une phosphotyrosine d'un RTK (récepteur à activité tyrosine kinase) activé, soit directement (**B**), soit par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice comme IRS1 (*Insulin receptor substrate 1*) (**A**). Elle est également susceptible d'être activée par une protéine RAS activée (c'est-à-dire liée au GTP) (**C**) ou par un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) (**D**). Dans ce dernier cas, c'est une forme particulière de PI3 kinase qui est activée.

La PI3 kinase peut également être activée par la protéine adaptatrice RAS que nous avons vue dans la voie des MAP kinases (chapitre 2). En effet, la sous-unité catalytique possède, du côté C-terminal, un domaine de reconnaissance de RAS activé. Il s'agit d'une interconnexion majeure entre les deux voies de signalisation, et les conséquences thérapeutiques de cette interconnexion sont importantes dans le cadre des thérapies ciblées. Enfin, la PI3 kinase peut également être activée par des récepteurs couplés aux protéines G (*GPCR, G protein-coupled receptors*) (chapitre 6) (fig. 3-1).

La PI3 kinase assure la phosphorylation en 3 d'un lipide membranaire particulier, le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, afin de le transformer en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (fig. 3-2). Contrairement à la voie de signalisation impliquant une phospholipase C, qui libère un triphosphoinositol (IP3) comme second messager (chapitre 6), c'est la présence du phosphate en 3 de l'inositol qui constitue le message proprement dit, du fait que ce phosphate est susceptible d'être reconnu par des protéines possédant un domaine particulier appelé PH (*Pleckstrin-homology domain*).

Il existe en fait quatre PI3 kinases de classe I, notées PIK3CA à PIK3CD, de spécificités tissulaire et fonctionnelle précises, qui ont une sous-unité catalytique p110α, β, γ ou δ et qui sont activées par divers types de sous-unités régulatrices. Ces PI3 kinases diffèrent en particulier par leur capacité à être activées par un RTK, un GPCR, une cytokine, une intégrine et/ou une protéine RAS. Les fonctions des PI3 kinases de classes II et III sont moins bien connues que celles des PI3 kinases de classe I et concernent le trafic membranaire et l'internalisation des récepteurs. Elles diffèrent également quant à leur substrat lipidique précis de la classe des inositides.

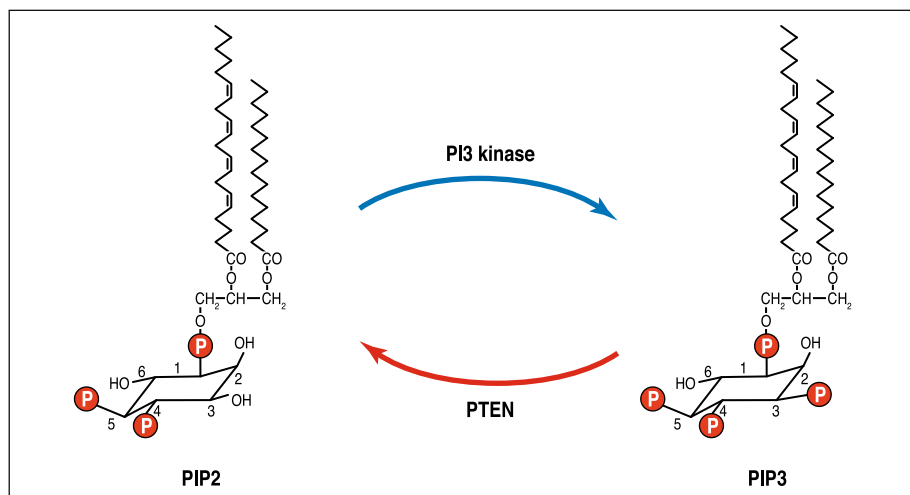


Fig. 3-2 – Activités catalytiques de la PI3 kinase et de PTEN.

La PI3 kinase convertit le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) ; PTEN réalise l'opération inverse. Le phosphatidylinositol est constitué d'un squelette de glycérol estérifiant deux acides gras, généralement un acide palmitique (C16:0) en 1 et un acide arachidonique (C20:4) en 2, et un acide phosphorique estérifiant à son tour un groupement inositol (hexa-hydroxy-cyclohexane) en 3.

La phosphorylation en 3 de l'inosite par la PI3K est contrebalancée par une déphosphorylation assurée par une phosphatase, PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*). Cette phosphatase assure la régulation négative de cette voie de signalisation. Elle est également capable d'une activité protéine phosphatase qui s'exerce dans d'autres voies de signalisation.

La présence d'un groupement phosphate en 3 sur l'inosite permet le recrutement à la membrane de protéines kinases à domaine PH, en particulier la PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) et la protéine AKT, anciennement nommée protéine kinase B (PKB). En raison vraisemblablement d'une disposition particulière au niveau de la membrane, liée à la reconnaissance du phosphoinositide, la PDK1 est susceptible de phosphoryler et d'activer une protéine AKT. Cette phosphorylation se fait sur la thréonine 308, au niveau du site catalytique. La protéine AKT est à l'origine de l'activation de multiples effecteurs, présentés sur la figure 3.3.

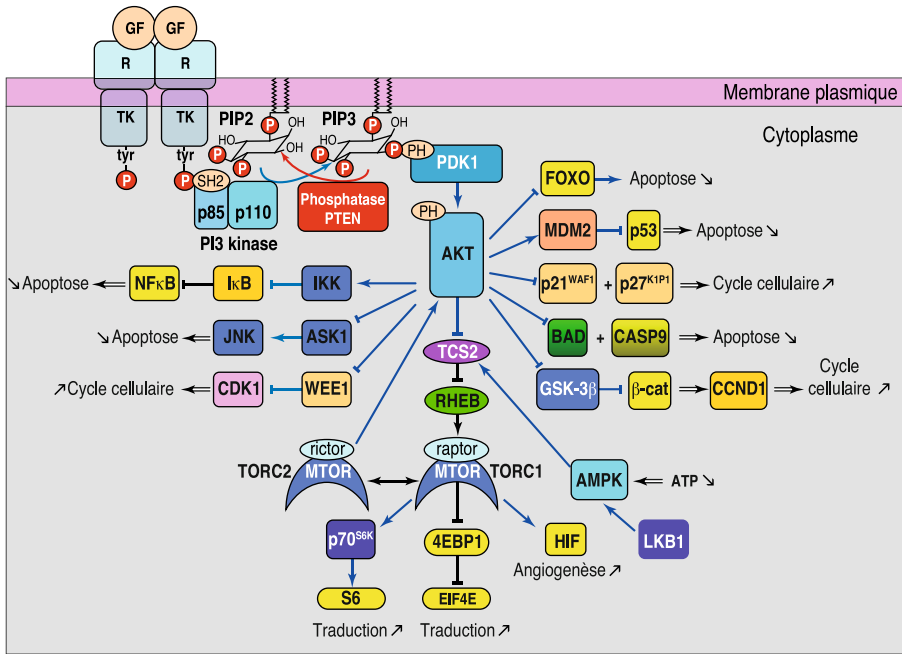


Fig. 3-3 – Schéma récapitulatif de la voie de la PI3 kinase après activation par un RTK.

Après activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase par un facteur de croissance GF, la sous-unité régulatrice p85 de la PI3 kinase, dotée d'un domaine SH2, se lie à une phosphotyrosine du récepteur. La sous-unité catalytique de la PI3 kinase, p110, réalise alors la phosphorylation du PIP2 en PIP3. La phosphatase PTEN réalise l'opération inverse. Le phosphate en 3 de l'inositol est reconnu par des sérine/thréonine kinases à domaine PH, PDK1 et AKT, la première phosphorylant la seconde. L'activation d'AKT lui permet de phosphoryler un large éventail de protéines, qui sont ainsi activées ou inhibées. L'une de ces protéines cibles est TSC2, dont la phosphorylation inhibe la stimulation de l'activité GTPasique de RHEB qu'elle exerce normalement. Le maintien de RHEB à l'état activé (lié au GTP) stimule la protéine MTOR. Engagée dans un complexe TORC1 avec la protéine RAPTOR, MTOR phosphoryle à son tour plusieurs protéines cibles ; engagée dans un complexe TORC2 avec la protéine RICTOR, elle phosphoryle AKT et renforce son action par feed-back positif. Les différentes cibles d'AKT et de MTOR ont toutes un effet positif sur la survie, la croissance et/ou la prolifération cellulaires.

Les protéines AKT et leurs substrats

Il existe trois protéines AKT, AKT1, 2 et 3, qui sont des sérine/thréonine kinases, activées elles-mêmes par phosphorylation et activant ou désactivant par phosphorylation une grande variété de protéines. Parmi les substrats des protéines AKT, et sans prétendre à l'exhaustivité, on peut citer :

- la protéine TSC2 (*Tuberous sclerosis complex 2*), inhibée par phosphorylation, qui, associée à TSC1, constitue un facteur activateur de GTPase (GAP, *GTPase activating*

protein) pour une protéine de la superfamille RAS nommée RHEB (*RAS homolog enriched in brain*) ; c'est par cette voie que se fait l'activation de MTOR (voir ci-dessous) ;

- la protéine BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*), qui est une protéine « *BH3 only* » impliquée dans la régulation positive de l'apoptose mitochondriale (voir chapitre 18). Cette protéine est inactivée par phosphorylation ;
- la protéine MDM2 (*Murine double-minute p53 binding protein*), activée par phosphorylation, qui est l'ubiquitine ligase de la protéine p53 (voir chapitre 17). L'activation de MDM2 s'oppose ainsi aux effets de p53 sur l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose ;
- la protéine p21^{CIP1} (CDKN1A) et la protéine p27^{KIP1} (CDKN1B), qui sont des inhibiteurs de CDK, donc des régulateurs négatifs de l'avancée dans la phase G1 du cycle cellulaire (voir chapitre 17). Elles sont inhibées par la phosphorylation qu'elles reçoivent d'AKT ;
- la protéine GSK3 β (*Glycogene synthase kinase 3 β*), qui intègre des signaux d'origine métabolique (voir plus loin) et que nous retrouverons jouer un rôle majeur dans la voie Wnt (chapitre 7). Cette protéine est inhibée par la phosphorylation induite par AKT ; ne pouvant plus phosphoryler la β -caténine, cette dernière peut se relocaliser dans le noyau et activer des programmes de transcription aboutissant entre autres choses à la cycline D1 ;
- la protéine IKK (*I κ B kinase*), activée par cette phosphorylation, et qui phosphoryle et inhibe la protéine I κ B, elle-même inhibiteur du facteur de transcription NF κ B (voir chapitre 12) ; AKT contrôle donc positivement NF κ B, qui lui-même est impliqué dans la survie cellulaire, la prolifération, la chimiorésistance, l'angiogenèse et l'invasion ;
- la protéine WEE1, inhibée par cette phosphorylation, qui est une tyrosine kinase inhibitrice du CDK1, nécessaire à l'entrée des cellules en mitose (voir chapitre 17) ;
- la protéine ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase-1*), inhibée par cette phosphorylation, qui est une MAP3K de la voie JNK (voir chapitre 2) impliquée dans le déclenchement de l'apoptose en réponse au stress du réticulum endothélial (voir chapitre 18 et Annexe C) ;
- les protéines FOXO (*Forkhead box class O*), qui sont des facteurs de transcription inducteurs d'apoptose en agissant à la fois sur la voie extrinsèque (TRAIL, FASL) et sur la voie mitochondriale (protéines BH3 only) (chapitre 18) ; leur phosphorylation par AKT entraîne leur relocalisation dans le cytoplasme et la perte de leurs fonctions sur la transcription.

Toutes les actions d'AKT orientent donc la cellule vers la prolifération et la survie.

La protéine MTOR et les complexes TORC

La protéine MTOR (*Mammalian target of rapamycin*) a été nommée ainsi par analogie avec une protéine de levure inhibée par un produit naturel, la rapamycine, après liaison à une petite protéine, FKBP12 (*FK506-binding protein 12*). C'est une sérine/thréonine kinase agissant en aval de l'activation d'AKT et impliquée dans la phosphorylation de nombreux substrats. On a cru longtemps qu'elle était activée par

phosphorylation directe par AKT. Son activation résulte en fait de l'action de la protéine RHEB, que nous avons mentionnée plus haut, lorsque cette dernière est liée au GTP. De la double inhibition de TSC2 par AKT et de RHEB par TSC2 résulte, en définitive, une activation de MTOR par AKT (fig. 3-4).

Outre son activation à partir d'AKT, MTOR est capable d'intégrer des signaux d'origine métabolique et nutritionnelle. Cela peut s'expliquer par le fait que la prolifération cellulaire requiert un état nutritionnel adapté à la synthèse de nouveau matériel cellulaire. L'hypoxie, l'hypoglycémie, l'excès de consommation énergétique par le

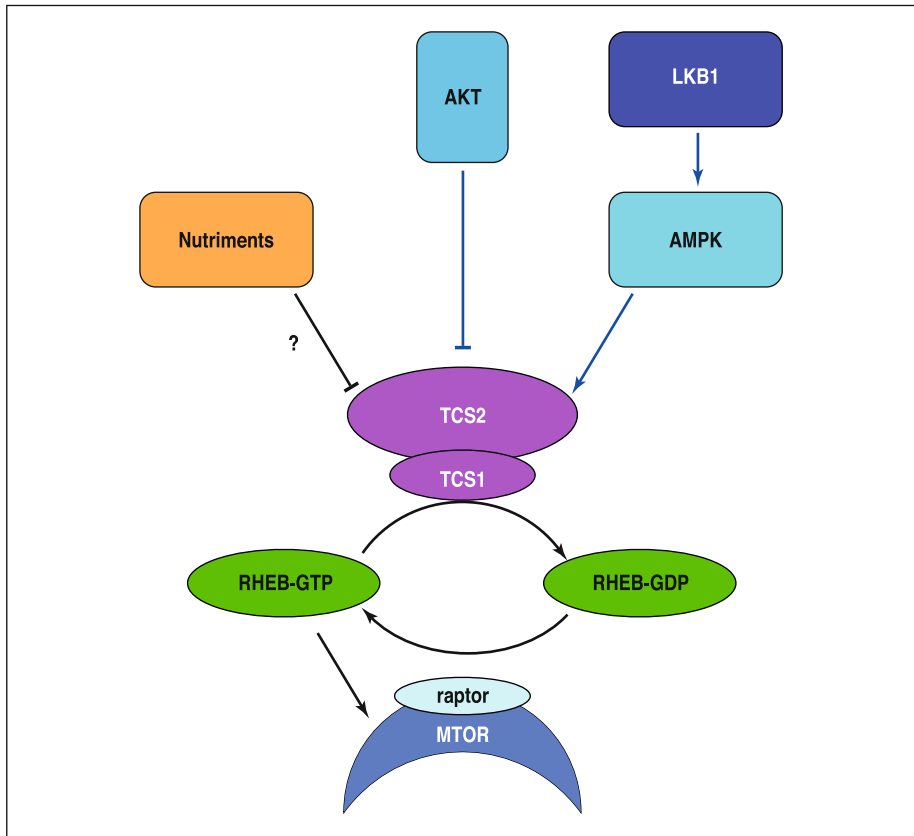


Fig. 3-4 – Activation de la protéine MTOR à partir de la protéine AKT.

Le complexe TSC1/TSC2, possède une activité GAP (*GTPase activating protein*) sur la protéine RHEB. La protéine RHEB, comme toutes les petites protéines G, existe sous une forme inactive, liée au GDP et sous une forme active, liée au GTP. Ces protéines se désactivent spontanément grâce à leur activité GTPasique intrinsèque. Des protéines d'échange GEF sont capables de les activer, des protéines GAP de les désactiver. Outre l'inhibition de TSC obtenue par la phosphorylation de TSC2 par AKT, le complexe TSC est capable d'intégrer des signaux liés à l'état métabolique et nutritionnel de la cellule. La diminution des taux d'ATP active l'AMPK, qui à son tour active TSC2. L'abondance de glucose et d'acides aminés inhibe TSC2 par un mécanisme inconnu.

muscle, entraînent une inhibition de MTOR. C'est l'AMP kinase (AMPK) qui constitue le véritable « senseur » de l'état nutritionnel de la cellule, représenté par le rapport AMP/ATP. L'AMPK active TSC2 par phosphorylation, ce qui a pour effet d'accélérer la désactivation de RHEB et, en dernier ressort, d'inhiber MTOR. L'abondance nutritionnelle, en revanche, et à l'aide de médiateurs encore non identifiés, a un effet inhibiteur sur TSC2, avec des conséquences opposées.

L'AMPK a également de nombreux effets métaboliques visant à renforcer l'entrée du glucose et son utilisation, la consommation du glycogène, ainsi que l'oxydation des acides gras ; elle a en outre un effet activateur de l'autophagie, toujours dans le cadre de l'épargne énergétique. L'AMPK est elle-même activée par diverses kinases, en particulier une sérine/thréonine kinase appelée LKB1, agissant sous la forme d'un complexe avec deux protéines, STRAD (*STE20-related adaptor*) et MO25 (*Mouse protein 25*). Outre son action sur l'AMPK, LKB1 phosphoryle et active des protéines impliquées dans la polarisation cellulaire, ce qui indique l'existence d'une connexion, longtemps insoupçonnée, entre le métabolisme énergétique et la polarité cellulaire épithéliale.

La protéine MTOR agit dans deux types de complexes distincts :

- le complexe TORC1, le mieux connu, où elle est associée à une protéine appelée RAPTOR (*Regulatory associated protein of TOR*) et à deux autres protéines. Ce complexe est sensible à la rapamycine et phosphoryle de nombreux substrats (voir ci-dessous) ;
- le complexe TORC2, où elle est associée à une protéine appelée RICTOR (*Rapamycin insensitive companion of TOR*) et à d'autres protéines, est insensible à la rapamycine et possède un seul substrat connu : la protéine AKT, qu'elle active par phosphorylation sur la sérine 473, au niveau C-terminal, jouant ainsi un rôle de feed-back positif.

À l'état basal, le complexe TORC1 est associé à un facteur d'initiation de la traduction, EIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*), par l'intermédiaire d'une protéine de répression, EIF4EBP1 (*EIF4E binding protein 1*). En absence de phosphorylation d'EIF4EBP1, le facteur EIF4E ne peut être libéré pour recruter les ribosomes chargés de démarrer le processus de traduction des ARN messagers en protéines. Lors de l'activation de MTOR, celle-ci peut phosphoryler EIF4EBP1, ce qui libère le facteur de traduction EIF4E, qui peut alors exercer ses effets sur la synthèse des protéines (fig. 3-5).

Parmi les substrats de MTOR lorsqu'elle est impliquée dans le complexe TORC1, on peut citer, outre la protéine EIF4EBP1 déjà mentionnée, la protéine p70^{S6K}, ou RPS6KB1, qui est une kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine S6 des ribosomes et la protéine HIF1 α (*Hypoxia-induced factor 1 α*) qui est un facteur de transcription impliqué dans la signalisation de l'angiogenèse (voir chapitre 16). La S6 kinase possède elle-même d'assez nombreux substrats, parmi lesquels la kinase PDK1 activatrice d'AKT, la protéine pro-apoptotique BAD (chapitre 18), ou encore un facteur activant l'élongation de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse, EEF2 (*Eukaryotic translation elongation factor 2*) (Annexe C).

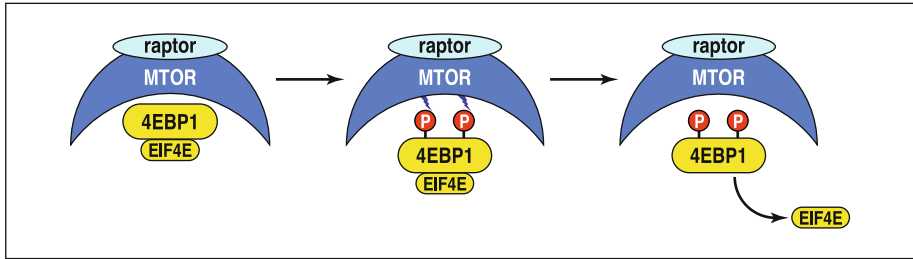


Fig. 3-5 – Activation du facteur d'élongation EIF4E à partir de la protéine MTOR.

MTOR est capable de phosphoryler une protéine 4EBP1, qui est normalement liée au facteur d'élongation EIF4E et l'empêche d'exercer ses effets sur la synthèse protéique. Cette phosphorylation diminue l'affinité de 4EBP1 pour EIF4E, ce qui le libère et lui permet de remplir son rôle positif sur la traduction.

Enfin, la protéine MTOR joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'autophagie. Cela a d'abord été suggéré par le fait que la rapamycine était susceptible d'induire l'autophagie, puis par la démonstration d'un effet inhibiteur direct de MTOR sur des kinases impliquées dans la réalisation du programme d'autophagie, comme le complexe ATG1-ATG13, sans doute par phosphorylation.

Les actions de MTOR convergent donc, directement ou indirectement, vers la synthèse protéique, la stimulation de l'angiogenèse, et par conséquent la croissance tissulaire.

Altérations oncogéniques

La voie de la PI3 kinase est riche en altérations, mutationnelles et non mutationnelles, capables de concourir à l'oncogenèse. La PIK3CA est elle-même une oncoprotéine majeure : les mutations de son gène sont fréquemment rencontrées, entre autres choses, dans les cancers du sein et du côlon. Les mutations activatrices siègent le plus souvent au niveau de trois acides aminés distincts, E542, E545 et H1047. Une amplification du gène ou une surexpression de la protéine peuvent également être rencontrées dans les cancers. La sous-unité régulatrice peut être, elle aussi, le siège de mutations activatrices, que l'on rencontre dans des syndromes lymphoprolifératifs et les cancers colorectaux.

La phosphatase PTEN, qui réverse l'action de la PI3 kinase, est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs de type *gatekeeper* dont les altérations sont retrouvées dans les cancers de l'endomètre, du sein, du côlon, de l'ovaire, les glioblastomes, les mélanomes, etc. Des mutations de PTEN dans la lignée germinale s'accompagnent d'un syndrome de prédisposition héréditaire au cancer appelé maladie de Cowden. L'inactivation de PTEN peut se produire par des mutations invalidantes, qui sont nombreuses, incluant des délétions, par méthylation du promoteur du gène, diminuant son expression, et par toute régulation transcriptionnelle négative.

Il a été décrit exceptionnellement des mutations oncogéniques activatrices d'AKT ; en revanche, un gain de fonction par amplification, surexpression et hyperphosphorylation est susceptible d'être fréquemment oncogénique. Une phosphorylation activatrice d'AKT sur la sérine 473 a été associée à de nombreux cancers (sein, pancréas, estomac, endomètre, prostate, etc.).

TSC1 et 2 doivent leur nom à une pathologie du développement liée à une prédisposition génétique aux cancers, la sclérose tubéreuse de Bourneville. Une mutation dans la lignée germinale, suivie d'une perte d'hétérozygotie au niveau somatique, explique classiquement l'implication de ces protéines dans l'oncogenèse.

Parmi les nombreux substrats des kinases AKT, certains activent des voies prononcogéniques, comme celles aboutissant à NFκB (chapitre 12), d'autres des voies anti-oncogéniques comme les facteurs de transcription FOXO, qui sont des suppresseurs de tumeurs impliqués dans les rhabdomyosarcomes et certaines leucémies : des remaniements chromosomiques entraînent une perte de fonction de ces facteurs proapoptotiques.

LKB1 a été identifiée originalement comme le produit d'un gène suppresseur de tumeurs. Ses mutations germinales s'accompagnent de la formation d'hamartomes et de polypes, en particulier au niveau du tube digestif, par effet d'haplo-insuffisance. Il semble que le rôle de cette protéine dans la polarité cellulaire épithéliale soit à l'origine de cette fonction de suppresseur de tumeurs, plus que son rôle dans le métabolisme énergétique.

Enfin, il n'a pas été décrit de mutations activatrices ni de surexpressions de MTOR dans les cancers, et le rôle direct de cette protéine dans l'oncogenèse reste incertain.

Cibles pharmacologiques

La plupart des protéines de la voie de la PI3 kinase peuvent constituer des cibles en vue d'un développement pharmacologique anticancéreux. Seuls les inhibiteurs de MTOR (dérivés de la rapamycine) sont parvenus au stade du médicament et sont actuellement sur le marché.

Deux produits naturels, la quercétine et la wortmannine, ont servi de base à la conception et à l'élaboration de molécules inhibitrices des PI3 kinases, agissant sur leur activité catalytique. Le fait que le complexe p110α-p85 a pu être cocrystallisé avec des inhibiteurs divers a servi de base à l'optimisation de tels inhibiteurs. Ces molécules présentent en fait une spécificité réduite en raison de la parenté structurale des sites catalytiques des sérine/thréonine kinases, tout particulièrement dans le cadre de la superfamille des PI3 kinases, qui comprend MTOR ainsi que les kinases destinées à la surveillance de l'état de l'ADN, ATM (*Ataxia telangiectasia-mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (voir Annexe A). Plusieurs molécules sont actuellement en essais cliniques.

La sérine/thréonine kinase PDK1 peut également être l'objet d'un ciblage. L'UCN-01, dérivé de la staurosporine, inhibiteur générique de nombreuses kinases et fort peu spécifique, a été utilisé dans l'optique d'inhiber PDK1. Des composés plus spécifiques ont toutefois été identifiés et sélectionnés pour des études ultérieures.

Les protéines AKT peuvent également être ciblées, d'une part par inhibition de leur activité catalytique (inhibiteurs de kinase), d'autre part par interférence avec leur domaine PH. Le développement des inhibiteurs de l'activité kinase est analogue à celui de tous les inhibiteurs de sérine/thréonine kinases et rencontre les mêmes problèmes de spécificité. Les composés identifiés comme pouvant cibler électivement AKT sont des inhibiteurs réversibles, interagissant avec le site de localisation de l'ATP et se comportent comme des ATP-mimétiques. Au niveau du domaine PH, certains lipides dont la chaîne aliphatique est une chaîne alkyle et non acyle avaient été développés en utilisation topique (miltéfosine) et ce n'est qu'ensuite que leur interférence avec AKT et sa localisation à la membrane a pu être mise en évidence. De nouvelles molécules interférant avec le domaine PH des protéines AKT sont activement recherchées.

La protéine MTOR bénéficie d'un inhibiteur naturel très spécifique, la rapamycine, agissant de façon allostérique et non au niveau du site catalytique, et qui a pu servir de base à un développement pharmacologique. Cette action est spécifique du complexe TORC1 et nécessite la liaison de la rapamycine avec une petite protéine appelée FKBP12 (*FK506-binding protein-12*). La rapamycine, sous le nom de sirolimus, est utilisée de longue date comme immunosuppresseur ; on lui a préféré ses analogues (rapalogues) dans le traitement des cancers, comme le temsirolimus (CCI-779), l'évérolimus (RAD001) ou le déforolimus (AP23573). Ces composés sont actifs dans le traitement des carcinomes rénaux et de quelques cancers dans lesquels la voie de la PI3 kinase est une voie « d'addiction » : syndromes de prédisposition au cancer par perte des gènes suppresseurs de tumeurs que sont PTEN ou TSC1/2. De nombreux marqueurs d'activité des dérivés de la rapamycine ont été proposés pour faciliter leur développement, en particulier le dosage de substrats phosphorylés de MTOR ou des protéines d'aval comme la S6 kinase. En dehors de la rapamycine, la protéine MTOR peut être ciblée par des inhibiteurs de son activité kinase, avec les problèmes déjà mentionnés pour l'inhibition de la PI3 kinase ou d'AKT.

Bibliographie

- Abraham RT, Gibbons JJ. (2007) The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 13: 3109-14.
- Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. (2005) Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer*; 5: 921-9.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 4: 335-48.
- Carracedo A, Pandolfi PP. (2008) The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*; 27: 5527-41.
- Chalhoub N, Baker SJ. (2009) PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*; 4: 127-50.
- Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. (2010) The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol*; 28: 1075-83.

- Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. (2006) Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*; 6: 184-92.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*; 7: 606-19.
- Faivre S, Kroemer G, Raymond E. (2006) Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 671-88.
- Fu Z, Tindall DJ. (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*; 27: 2312-9.
- Garcia-Echeverria C, Sellers WR. (2008) Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene*; 27: 5511-26.
- Guertin DA, Sabatini DM. (2007) Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*; 12: 9-22.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; 4: 988-1004.
- Ihle NT, Powis G. (2009) Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy. *Mol Cancer Ther*; 8: 1-9.
- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. (2005) Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet*; 37: 19-24.
- Keniry M, Parsons R. (2008) The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*; 27: 5477-85.
- Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM. (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol*; 27: 2278-87.
- Yang JY, Hung MC. (2009) A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res*; 15: 752-7.
- Yap TA, Garrett MD, Walton MI *et al.* (2008) Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr Opin Pharmacol*; 8: 393-412.
- Yin Y, Shen WH. (2008) PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*; 27: 5443-53.
- Yuan TL, Cantley LC. (2008) PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*; 27: 5497-510.
- Zhao L, Vogt PK. (2008) Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*; 27: 5486-96.

Chapitre 4

La voie des cytokines

Introduction

Un groupe important de molécules de signalisation opère par une voie un peu différente de celle étudiée au chapitre 1 : les récepteurs de ces molécules ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase, mais sont couplés à une tyrosine kinase intracytoplasmique qui assure, après activation du récepteur, la transduction d'un message aboutissant à la transcription de gènes cibles. La principale voie de signalisation mise en jeu après reconnaissance de ces récepteurs par leurs ligands implique la kinase cytoplasmique JAK (acronyme de *Just another kinase* devenu celui de *Janus kinase*) et les facteurs de transcription STAT (*Signal transducer and activator of transcription*), mais l'activation d'autres kinases est possible, avec des connexions vers la voie des MAP kinases (chapitre 2) et celle de la PI3 kinase (chapitre 3). Les cytokines sont impliquées dans des phénomènes très variés : multiplication et différenciation des cellules sanguines, immunité et inflammation, défense antivirale, contrôle de la lactation, de la taille et du poids, etc.

Ce sont, entre autres, les facteurs de croissance hématopoïétiques (CSF, *Colony-stimulating factors*) qui reconnaissent ces récepteurs sans activité kinase, ainsi que quelques hormones, plusieurs protéines que l'on appelle interleukines (IL) en raison de leur activité de signalisation entre globules blancs, et les interférons (IFN) qui « interfèrent » avec la multiplication virale. Les différents termes proviennent de champs différents (immunologie, hématologie, endocrinologie, virologie) ; nous regrouperons sous le terme générique de cytokines l'ensemble des molécules qui activent des récepteurs sans activité tyrosine kinase, mais liés à une tyrosine kinase cytoplasmique. Nous n'évoquerons pas ici le CSF1 (M-CSF) qui active un récepteur à activité tyrosine kinase (chapitre 1), ni l'interleukine 8 qui est une chimiokine activant un récepteur couplé à une protéine G (chapitre 6), ni le TNF (*Tumor necrosis factor*) et ses analogues, étudiés dans le chapitre 18, qui activent des récepteurs de mort, ni les interleukines 1, 18 et 33 qui appartiennent à une famille particulière apparentée aux récepteurs *toll-like* (chapitre 12).

Les cytokines

Près de quarante cytokines fonctionnant par activation d'une tyrosine kinase cytoplasmique ont été identifiées et peuvent être réparties en deux types en fonction de leur structure générale et de celle de leurs récepteurs (tableau 4-1). Le type I, caractérisé par la présence d'une structure à quatre hélices α , peut être subdivisé, en simplifiant quelque peu, en plusieurs sous-familles :

- la famille de l'IL2 : IL2, IL4, IL7, IL9, IL15, IL21 ;
- la famille de l'IL6 : IL6, IL11, IL27, LIF (*Leukemia inhibiting factor*), CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*), OSM (*Oncostatin M*) ;
- la famille du GM-CSF : IL3, IL5, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) ;
- la famille de l'IL12 (IL12 et IL23) ;
- la famille des autres facteurs de croissance hématopoïétiques et des hormones : G-CSF (*Granulocyte colony stimulating factor*), EPO (érythropoïétine), TPO (thrombopoïétine), hormone de croissance GH (*Growth hormone*), prolactine (PRL) et leptine (LEP ou OBS).

Le type II contient les interférons et deux sous-familles d'interleukines, celle de l'IL10 (IL10, IL22, IL26) et celle de l'IL20 (IL19, IL20, IL24).

Les cytokines possèdent chacune de nombreuses fonctions et leurs actions, contrairement à ce que l'on avait pensé, ne sont pas limitées à un tissu cible unique mais apparaissent pléiotropes. Elles sont également redondantes, en ce sens que diverses cytokines peuvent jouer des rôles identiques sur certains tissus cibles. Il n'est pas possible de détailler ici le rôle de chaque cytokine et nous renvoyons le lecteur vers les ouvrages d'immunologie et d'hématologie, entre autres. Nous nous intéresserons essentiellement aux facteurs de croissance (et d'inhibition de croissance) hématopoïétiques en raison de leur rôle dans la prolifération des cellules sanguines, sans oublier que l'inflammation induite ou combattue par les diverses interleukines joue un rôle important dans l'oncogenèse. Enfin, l'IL2, l'interféron α et certains facteurs de croissance hématopoïétiques font partie de l'arsenal thérapeutique de la cancérologie.

Les récepteurs et l'activation des kinases JAK

Les récepteurs des cytokines sont des protéines membranaires à un seul domaine transmembranaire et ayant leur partie N-terminale du côté extracellulaire. Ils sont caractérisés par la présence de résidus cystéine du côté N-terminal du domaine extracellulaire et d'un motif à deux tryptophanes et deux sérines (WSXWS) du côté C-terminal de ce même domaine. La partie intracellulaire ne contient aucun site catalytique mais plusieurs domaines assez conservés, en particulier la *Box 1*, proche du domaine transmembranaire, caractérisée par la présence d'un motif de huit acides aminés, riche en proline, et la *Box 2*, faite d'un groupe d'acides aminés hydrophobes prolongeant l'hélice α du domaine transmembranaire, suivi d'une série d'acides aminés chargés et de résidus tyrosine destinés à recevoir un groupement phosphate.

Tableau 4-1 – Les principales cytokines, leurs récepteurs et la voie qu’elles activent en aval.

Type	Cytokine	Récepteur spécifique	Récepteur associé	Kinase	Facteur de transcription
Type I	IL2	IL2R α/β	IL2R γ c (IL2RG)	JAK1 + JAK3	STAT5
	IL7	IL7R α			
	IL9	IL9R α			
	IL15	IL15R α			STAT6 STAT1, 3
	IL4	IL4R α			
	IL21	IL21R α			
	GM-CSF (CSF2)	GM-CSFR α (CSF2A)	IL3R β c (CSF2RB)	JAK2	STAT5
	IL3	IL3R α			
	IL5	IL5R α			
	IL6	IL6R α	gp130 (IL6ST)	JAK1	STAT1, 3, 5
	IL11	IL11R α			
	CNTF	CNTFR α			
	LIF	LIFR			
	OSM	OSMR			
	IL27	IL27R α/β	IL12R β 1	JAK2 + TYK2	STAT4 STAT3
	IL12	IL12R β 2			
	IL23	IL23R α			
	GH	GHR		JAK2	STAT5
	PRL	PRLR			
	OBS (LEP)	OBR (LEPR)			
	EPO	EPOR			
	TPO	TPOR			
	G-CSF (CSF3)	G-CSFR (CSF3R)			
Type II	IFN α , β , ω , τ	IFN α R1	IFN α R2	JAK1 + TYK2	STAT1, 2, 3, 5
	IFN γ	IFN γ R1	IFN γ R2	JAK1 + JAK2	
	IL10	IL10R α	IL10R β	JAK1 + TYK2	STAT1, 3, 5
	IL22	IL22R α			
	IL26	IL20R α			
	IL19, 20	IL20R α	IL20R β		
	IL24	IL22R α			

Les deux « boîtes » sont impliquées dans la liaison du récepteur avec une protéine JAK. Un des récepteurs, le CNTFR, ne contient pas de domaine transmembranaire ni intracellulaire et est fixé à la membrane plasmique par ancrage avec un glycosyl-phosphatidylinositol (Annexe C). Plusieurs récepteurs présentent des formes solubles variantes obtenues par épissage alternatif. C’est le cas des IL4, IL5, IL7, IL9, du LIF, du G-CSF, du CNTF et des hormones GH et PRL. Ces formes solubles agissent comme des transporteurs ou des pièges pour les cytokines. Certains récepteurs sont des récepteurs leurres qui reconnaissent un ligand, mais ne transmettent aucun signal.

Les récepteurs des cytokines doivent se dimériser pour activer la voie de signalisation. Les dimères et leur ligand constituent le « complexe de réception » caractéris-

tique du message à transmettre. Ce peut être une hétérodimérisation entre un monomère spécifique du ligand appelé récepteur « de type α » et un monomère commun pour une sous-famille de ligands (récepteur « de type β ou γ »), dont les plus fréquents sont appelés IL3R β ou βc pour la sous-famille du GM-CSF, IL2R γ ou γc pour la sous-famille de l'IL2 et gp130 ou IL6ST (*IL6 signal transducer*) pour la sous-famille de l'IL6 (voir tableau 4-1). Il en est de même avec les cytokines de type II avec IL10R β et IL20R β comme récepteurs communs des cytokines des sous-familles de l'IL10 et de l'IL20, respectivement. Dans le cas des hormones et des autres facteurs de croissance hématopoïétiques, qui n'ont qu'un seul type de molécule de récepteur, c'est une homodimérisation qui se produit lors de l'activation du récepteur. Un total de trente-six complexes de réception a été dénombré jusqu'ici. La figure 4-1 en présente quelques-uns.

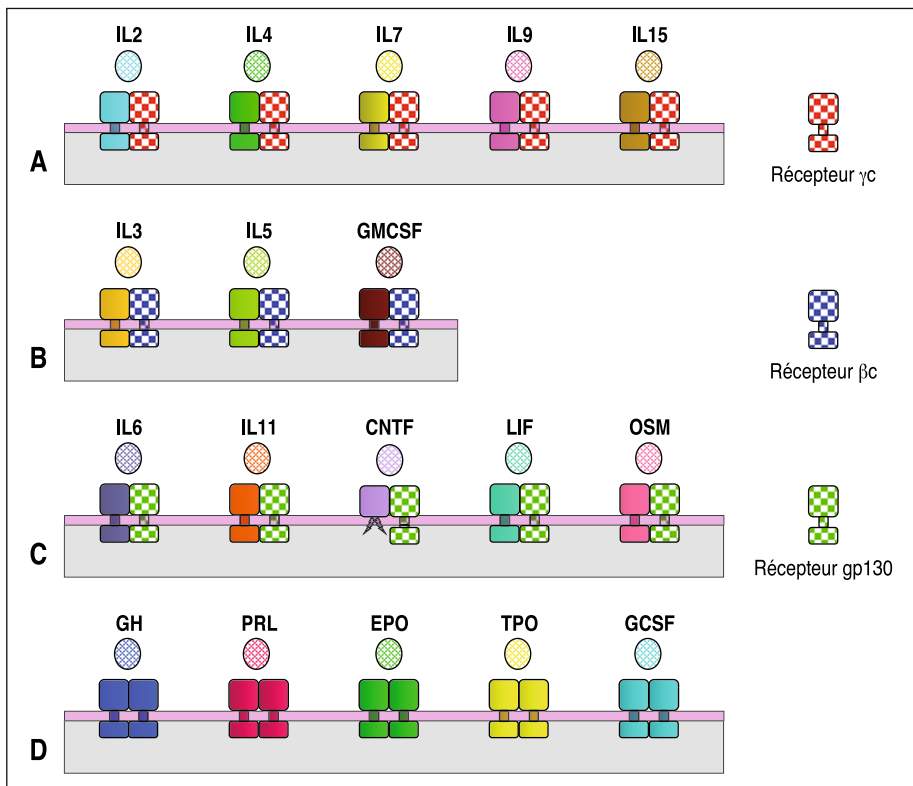


Fig. 4-1 – Les complexes de récepteur du signal apporté par quelques cytokines de type I.

Les dimères de récepteur formés par la reconnaissance d'une cytokine sont divers : en **A**, la dimérisation se fait entre un récepteur spécifique de la cytokine, dit de type α , et un récepteur commun γc (IL2R γc) ; en **B**, elle est réalisée entre un récepteur spécifique de type α et un récepteur commun βc (IL3R βc) ; en **C**, elle est réalisée entre un récepteur spécifique de type α et un récepteur commun gp130 (IL6ST) ; en **D**, elle est réalisée entre deux récepteurs spécifiques identiques.

Dans le cas de l'homodimérisation des récepteurs, celle-ci est réalisée de façon séquentielle, la cytokine se fixant d'abord sur un récepteur, le changement de conformation permettant ensuite la fixation d'un second récepteur puis l'interaction entre les deux molécules de récepteur. Le phénomène d'hétérodimérisation est complexe et suit divers modèles d'association entre la sous-unité spécifique de type α et la sous-unité commune de type β , γ ou gp130.

Les molécules de récepteur sont associées de façon constitutive aux kinases JAK. La dimérisation des récepteurs permet l'activation de ces kinases JAK qui réalisent leur autophosphorylation croisée, puis la phosphorylation du récepteur au niveau de résidus tyrosine des *Box 1* (fig. 4-2). Il existe quatre kinases JAK, nommées JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. L'association entre le récepteur et une kinase JAK se fait selon les modalités présentées dans le tableau 4-1. Certains récepteurs sont associés à deux protéines JAK identiques, JAK1 ou JAK2, d'autres à deux protéines JAK distinctes :

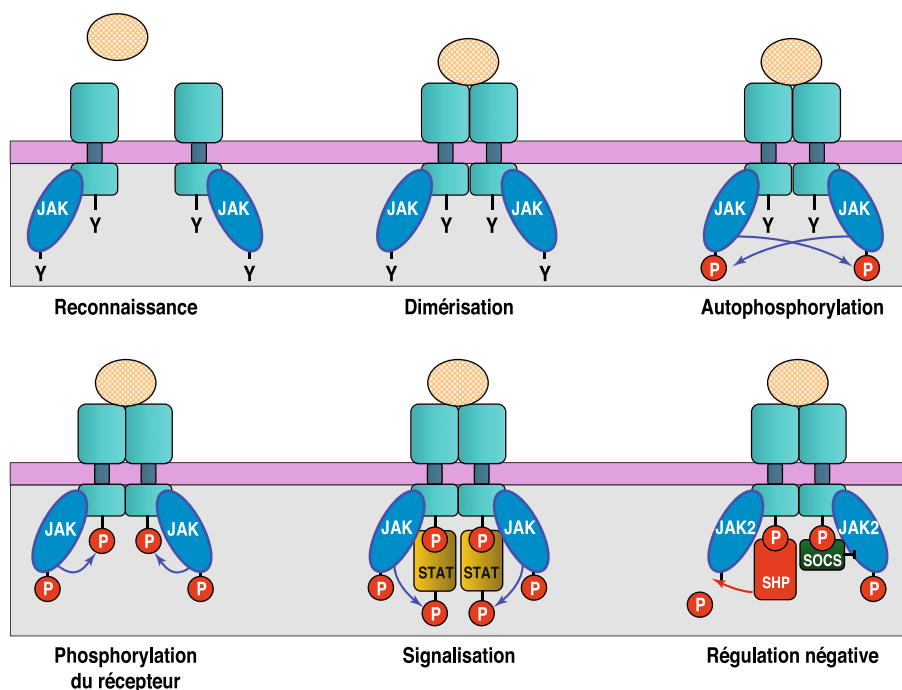


Fig. 4-2 – L'activation des récepteurs des cytokines *via* les kinases JAK.

Les protéines JAK sont associées de façon constitutive aux récepteurs. La reconnaissance d'une cytokine permet la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation croisée des protéines JAK associées. Ces dernières phosphorylent également le récepteur, ce qui permet la reconnaissance de phosphotyrosines par diverses protéines, dont les principales sont les protéines STAT, qui sont phosphorylées par les kinases JAK. La régulation négative de la signalisation est réalisée en particulier par les protéines SOCS qui prennent la place des protéines STAT sur les phosphotyrosines du récepteur et inhibent la kinase JAK, et par les phosphatases SHP qui se lient au récepteur et déphosphorylent les kinases JAK.

JAK1-JAK2, JAK1-JAK3, JAK1-TYK2 ou JAK2-TYK2. On n'a identifié aucun récepteur associé à deux protéines JAK3 ou TYK2 ou à des combinaisons JAK2-JAK3 ou JAK3-TYK2. L'activité kinase des protéines JAK permet dans un premier temps la phosphorylation du récepteur sur une tyrosine, puis la phosphorylation des facteurs de transcription STAT qui sont recrutés à la membrane grâce à l'existence d'un domaine SH2 de reconnaissance des tyrosines phosphates du récepteur activé.

Les protéines JAK sont caractérisées par la présence de plusieurs domaines homologues JH (*JAK homology domains*) (fig. 4-3) : un domaine JH1 C-terminal, portant l'activité kinase, un domaine JH2 pseudo-kinasique susceptible de contrôler négativement l'activité kinase, ainsi qu'un domaine SH2 et un domaine appelé FERM (*Four-point-one, ezrin, radixin and moesin*) en N-terminal, impliqué dans la liaison avec le récepteur. Les différentes protéines JAK ne sont pas redondantes, mais jouent des rôles spécifiques. JAK1, JAK2 et TYK2 sont ubiquitaires, mais JAK3 est spécifiquement exprimé dans le tissu hématopoïétique et est activé en réponse à l'action des cytokines de la sous-famille de l'IL2. JAK1 est activé en réponse à l'action de nombreuses cytokines, en particulier les sous-familles de l'IL2, de l'IL6, et des cyto-

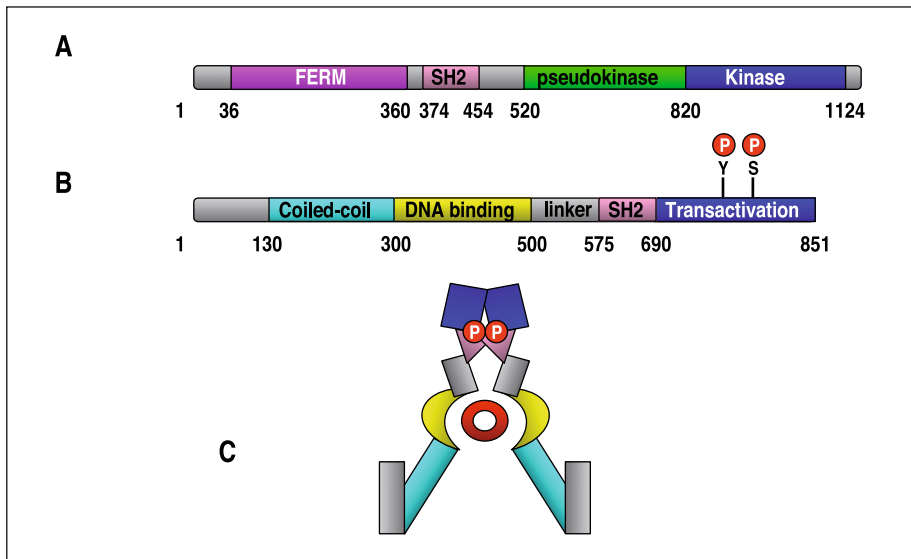


Fig. 4-3 – Structure générale des protéines JAK et STAT.

A. Les protéines JAK possèdent un domaine kinase et un domaine pseudokinase, un domaine SH2 de reconnaissance des phosphotyrosines du récepteur activé, et un domaine FERM (N-terminal) d'interaction avec le récepteur.

B. Les protéines STAT possèdent un domaine de transactivation porteur de la tyrosine phosphorylée par JAK et d'une sérine régulatrice, un domaine SH2 de reconnaissance des phosphotyrosines du récepteur activé, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine « *coiled coil* » (c'est-à-dire serpent) en N-terminal.

C. Représentation schématisque d'une protéine STAT après dimérisation, d'après les données de cristallographie : les domaines de liaison à l'ADN viennent enserrer une molécule d'ADN (en rouge) ; les domaines SH2 de chaque monomère sont associés à une phosphotyrosine de l'autre monomère.

kines de type II. JAK2 est caractéristique de la réponse aux facteurs de croissance hématopoïétiques comme l'EPO et des hormones. TYK2 intervient surtout en réponse aux cytokines du groupe II.

La transmission du signal

Les kinases JAK réalisent donc la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille STAT. Il existe sept protéines STAT numérotées STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6. L'expression des protéines STAT est ubiquitaire. Elles possèdent un domaine SH2 très conservé qui permet leur recrutement par le récepteur phosphorylé et un résidu tyrosine en C-terminal qui est le site de phosphorylation (fig. 4-3). Cela entraîne la formation d'homodimères ou d'hétérodimères des protéines STAT phosphorylées, grâce aux interactions réciproques entre le domaine SH2 de l'une et la phosphotyrosine de l'autre. Ces dimères migrent alors dans le noyau et reconnaissent les séquences promotrices de gènes cibles, grâce à leur domaine de liaison à l'ADN (fig. 4-4). Une ou plusieurs protéines STAT distinctes

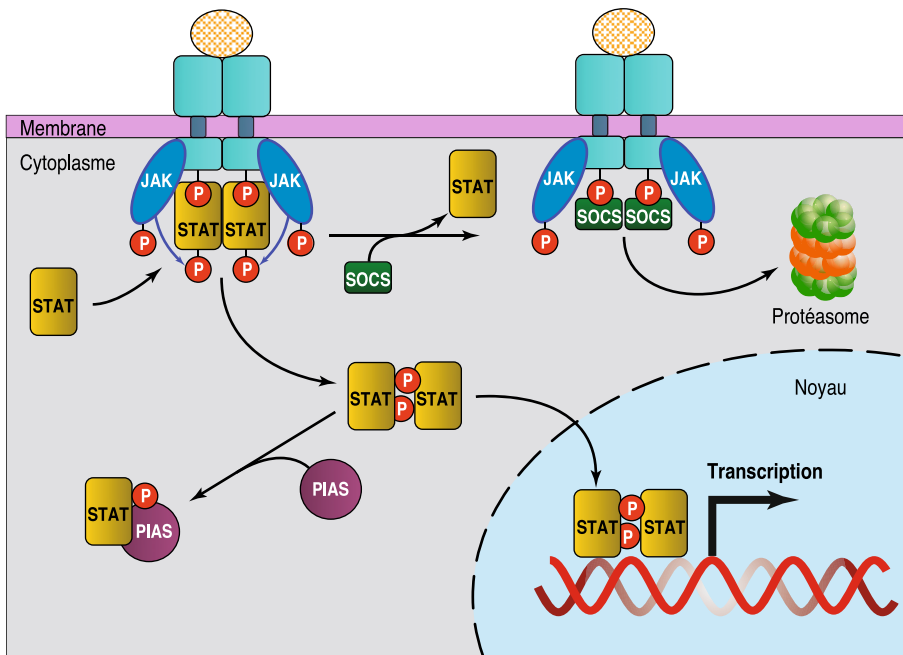


Fig. 4-4 – La voie de signalisation JAK-STAT.

Après phosphorylation, les dimères de protéines STAT migrent vers le noyau où ils reconnaissent des promoteurs de gènes cibles et activent leur transcription. La protéine PIAS peut toutefois se fixer sur STAT et empêcher la dimérisation. Les protéines SOCS inhibent la transmission du signal en se fixant sur le récepteur pour empêcher la fixation et la phosphorylation des protéines STAT ; elles inhibent la kinase JAK et conduisent le complexe de récepteur vers la dégradation dans le protéasome.

peuvent être activées en réponse à la liaison d'un ligand avec un récepteur, selon le contexte cellulaire (type de tissu, état de différenciation, concentration du ligand). Les actions des protéines STAT ne sont pas redondantes : STAT1 est assez spécifique des IFN, STAT3 est activé de préférence par les cytokines de la famille de l'IL6, STAT4 est activé par l'IL12, STAT6 par l'IL4 et STAT5 par les cytokines des familles de l'IL2, du GM-CSF, des hormones et des facteurs de croissance hématopoïétiques.

Un des principaux modes de régulation de la transmission du signal apporté par les cytokines est mis en œuvre par les protéines SOCS (*Suppressor of cytokine signaling*), également appelées SSI (*STAT-induced STAT inhibitor*) ou JAB (*JAK binding protein*). Il existe huit protéines SOCS nommées de SOCS1 à SOCS7 et CIS (*Cytokine-inducible SH2-domain-containing protein*). Ces protéines possèdent un domaine SH2 qui se lie au récepteur et empêche ainsi la liaison avec une protéine STAT, ainsi qu'un domaine d'inhibition de JAK appelé KIR (*Kinase-inhibitory region*) ; elles possèdent également une *SOCS box* qui recrute les E3 ubiquitine ligases (voir Annexe C) permettant la destruction des complexes de réception et peut-être des protéines STAT elles-mêmes. Les gènes SOCS sont des gènes cibles des facteurs de transcription STAT, ce qui permet un rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation. Une autre régulation négative est apportée par les protéines PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT*) qui sont capables de se lier aux protéines STAT phosphorylées en empêchant leur dimérisation. Enfin, les phosphatases SHP (*SH2-domain-containing phosphatase*) ou PTPN (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor*), dotées de domaines SH2, sont capables de déphosphoryler les kinases JAK.

Les gènes cibles des facteurs de transcription STAT sont nombreux, mais leur identification reste incomplète. STAT3 est fortement impliqué dans la prolifération cellulaire, avec des gènes cibles codant pour les protéines BCL2 (chapitre 18), les cyclines D (chapitre 17), des facteurs de croissance comme le VEGF (chapitre 1), des facteurs de transcription comme MYC, JUN et FOS (chapitre 2). STAT3 est en revanche un répresseur de la transcription du gène *TP53* (chapitre 17). Il est paradoxal de constater qu'il existe une multiplicité des signaux susceptibles d'activer la voie JAK-STAT ainsi qu'une grande variété des associations ligand-récepteur, alors que ces associations aboutissent à l'activation d'un petit nombre de facteurs STAT différents.

Il existe de nombreuses interconnexions entre la voie JAK-STAT et les autres voies de signalisation. Les kinases JAK, du fait qu'elles possèdent un domaine SH2, sont capables de reconnaître les phosphotyrosines de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) décrits dans le chapitre 1 : elles peuvent ainsi activer une protéine STAT en réponse à un facteur de croissance. Par ailleurs, elles sont capables d'activer les voies situées classiquement en aval des RTK, comme la voie des MAP kinases (chapitre 2) et la voie de la PI3 kinase (chapitre 3).

Altérations oncogéniques

Il existe de nombreuses altérations pathologiques de cette voie de signalisation ; beaucoup d'entre elles concernent les mécanismes de l'immunité : déficiences immunitaires, maladies inflammatoires et auto-immunes. Signalons par exemple l'association

entre les mutations de JAK3 et les syndromes d'immunodéficience sévère SCID (*Severe combined immunodeficiency*) chez la souris comme chez l'homme. Nous n'entrerons pas dans le détail de la pathologie immunitaire liée aux altérations moléculaires de la voie des cytokines. Sur le plan de l'oncogenèse, de nombreuses altérations ont été décrites à tous les niveaux de cette voie de signalisation : les récepteurs des facteurs de croissance hématopoïétiques, les kinases JAK, les facteurs de transcription STAT et leurs inhibiteurs SOCS.

Le récepteur IL3R α est surexprimé dans les blastes de plus de 80 % des leucémies aiguës myéloïdes, entraînant une augmentation de l'activation de STAT5. Dans d'autres cas, c'est le récepteur commun, IL3R β , qui est exprimé sous une forme tronquée. Les formes tronquées des récepteurs les rendent en effet insensibles à l'ubiquitylation. De même, une version tronquée du G-CSFR est associée à une suractivation de STAT5 et des mutations ponctuelles de ce récepteur sont également rencontrées dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Enfin, des mutations du récepteur de la thrombopoïétine (TPOR) ont été rencontrées dans des syndromes myéloprolifératifs.

La découverte de la mutation V617F de JAK2 dans plusieurs syndromes myéloprolifératifs a constitué une étape importante dans la connaissance de la genèse de ces hémopathies malignes (polyglobulie essentielle ou maladie de Vaquez, thrombocythémie essentielle, myélofibrose idiopathique). Cette mutation survient dans le domaine JH2 de JAK2 et a pour conséquence une activation constitutive de JAK2, conduisant à une hypersensibilité des récepteurs. D'autres altérations moléculaires de JAK2, en particulier des translocations et des amplifications, avaient été décrites dans les leucémies et les lymphomes. De nouvelles mutations de JAK2 ont été décrites dans les syndromes myéloprolifératifs, les LAL (leucémies aiguës lymphoblastiques) et les leucémies aiguës à mégacaryocytes. Des mutations activatrices de JAK1 ont été récemment décrites dans des leucémies aiguës lymphoblastiques à cellules T et des mutations de JAK3 dans des leucémies aiguës à mégacaryocytes.

Bien qu'aucune mutation des protéines STAT n'ait été rencontrée dans les cancers, celles-ci se comportent fréquemment comme des oncogènes. L'activation constitutive de STAT1 se rencontre dans les LAM, les LAL à cellules B, les érythroleucémies ; celle de STAT3 dans la maladie de Hodgkin et certaines LAM, mais aussi dans des tumeurs solides (carcinomes hépatocellulaires, du sein, de la prostate) ; celle de STAT5 dans les érythroleucémies, les LAM, les LAL, les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et les leucémies à mégacaryocytes. Toutefois, les protéines STAT peuvent jouer un rôle ambivalent : STAT1 est un promoteur de l'apoptose dans la signalisation par les interférons et pourrait se comporter comme un suppresseur de tumeurs dans les stades tardifs de l'oncogenèse en induisant l'apoptose. De même, STAT3 est activé par l'IL10, qui est une cytokine anti-inflammatoire, et pourrait réduire l'oncogenèse liée à l'inflammation.

Les protéines SOCS se comportent comme des suppresseurs de tumeurs ; une méthylation du promoteur de SOCS1, conduisant à son inactivation, a été observée dans près de 60 % des LAM ainsi que dans les LMC et les carcinomes hépatocellulaires. De même, une méthylation du promoteur de SOCS3 est rencontrée dans les hépatocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes.

Cibles pharmacologiques

Depuis 1992, l'IL2 recombinante (aldesleukine) a été introduite dans le traitement des cancers du rein métastatiques et des mélanomes malins, deux cancers particulièrement résistants à la chimiothérapie et qui paraissaient associés à une déficience immunitaire. Le mécanisme de son action antitumorale reste incompris. Elle augmente la prolifération des lymphocytes et l'expansion clonale de cellules tueuses, ainsi que la production d'autres cytokines comme le TNF (*Tumor necrosis factor*), l'IL1 et l'interféron γ . À l'inverse, une approche anti-IL2 pourrait se révéler intéressante dans le traitement de certains cancers pour lesquels elle joue un rôle pathogène : leucémies et lymphomes à cellules T, maladie de Hodgkin, lymphomes folliculaires et leucémie à tricholeucocytes. L'interféron α a trouvé des indications, en dehors des hépatites B et C, dans le traitement des LMC, des leucémies à tricholeucocytes, du sarcome de Kaposi et des mélanomes malins métastatiques.

La toxicité hématologique de la chimiothérapie à haute dose a encouragé le développement de formulations thérapeutiques des facteurs de croissance hématopoïétiques pour accélérer la production des cellules progénitrices. L'EPO dans le traitement des anémies, la TPO dans celui des déficiences plaquettaires majeures, le G-CSF et le GM-CSF dans celui des neutropénies, ont ainsi été introduits dans l'arsenal thérapeutique des oncologues.

Le ciblage des voies de transduction initiées par les cytokines est encore expérimental. S'il paraît possible de cibler les récepteurs eux-mêmes avec des anticorps monoclonaux, la spécificité de leur action reste un problème majeur en raison de l'extrême variété des effets induits par les cytokines. Le ciblage de l'activité tyrosine kinase des protéines JAK apparaît en revanche riche d'avenir et se fonde sur les réussites déjà obtenues par le ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase (chapitre 1) ou des tyrosine kinases cytoplasmiques comme BCR-ABL ou SRC. Des petites molécules ciblant les kinases JAK sont à l'étude ; le problème de la spécificité de ces composés sera certainement le plus délicat à résoudre. Plusieurs composés inhibant sélectivement JAK3 sont en développement dans des indications non oncologiques : arthrite rhumatoïde, maladies auto-immunes, rejet de greffe. Plusieurs autres inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant JAK2 sont en phase I pour le traitement des syndromes myéloprolifératifs, en particulier le lestaurtinib (CEP-701), un inhibiteur de FLT3 utilisé dans le traitement des leucémies aiguës.

Le ciblage des facteurs de transcription, en particulier STAT3 et STAT5, est plus difficile. On peut envisager l'utilisation de peptidomimétiques inhibant la dimérisation des protéines STAT, d'oligonucléotides antisens ou de siRNA inhibant leur synthèse, d'oligonucléotides reproduisant la séquence nucléique cible et servant de leurre, ou d'isoformes des protéines STAT permettant de les inhiber par dominance négative. Toutes ces approches sont encore éloignées des possibilités thérapeutiques.

Bibliographie

- Benekli M, Baumann H, Wetzler M. (2009) Targeting signal transducer and activator of transcription signaling pathway in leukemias. *J Clin Oncol*, sous presse.
- Constantinescu SN, Girardot M, Pecquet C. (2007) Mining for JAK–STAT mutations in cancer. *Trends Biochem Sci*; 33: 122-31.
- Gadina M, Hilton D, Johnston JA *et al.* (2001) Signaling by Type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*; 13: 363-73.
- Germain D, Frank DA. (2007) Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 13: 5665-9.
- Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. (2006) Jaks and cytokine receptors – An intimate relationship. *Biochem Pharmacol*; 72: 1538-46.
- Ihle JN. (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature*; 377: 591-4.
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW *et al.* (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol*; 13: 369-98.
- Kishimoto T, Taga T, Akira S. (1994) Cytokine signal transduction. *Cell*; 76: 253-62.
- Moutoussamy S, Kelly PA, Finidori J. (1998) Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signaling. *Eur J Biochem*; 255: 1-11.
- Murray PJ. (2007) The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol*; 178: 2623-9.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*; 109: S121-31.
- O'Sullivan LA, Liongue C, Lewis RS *et al.* (2007) Cytokine receptor signaling through the Jak–Stat–Socs pathway in disease. *Mol Immunol*; 44: 2497-506.
- Pesu M, Laurence A, Kishore N *et al.* (2008) Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev*; 223: 132-42.
- Renauld JC. (2003) Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol*; 3: 667-76.
- Taniguchi T. (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science*; 268: 251-5.
- Tayal V, Kalra BS. (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – an update. *Eur J Pharmacol* 2008; 579: 1-12.
- Yoshimura A. (2006) Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci* 2006; 97: 439-47.

Chapitre 5

La voie du TGF β

Introduction

Le TGF β (*Transforming growth factor beta*) est le représentant le plus connu d'une famille importante de facteurs de croissance qui sera étudiée dans ce chapitre, et qui comprend les TGF β et plusieurs sous-familles de facteurs morphogènes comme les BMP (*Bone morphogenetic proteins*). Les récepteurs de ces facteurs de croissance possèdent une activité enzymatique de sérine/thréonine kinase, ce qui les distingue de la famille des récepteurs portant une activité tyrosine kinase (chapitre 1). Ils sont impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire, mais aussi dans de nombreux autres processus comme l'inflammation et la fibrose. D'une façon générale, la voie du TGF β s'oppose à la prolifération cellulaire, et c'est par son inhibition qu'elle joue un rôle dans l'oncogenèse précoce ; toutefois, elle joue un rôle ambivalent, car elle favorise la dissémination cellulaire et par conséquent la métastase.

Les facteurs de croissance de la famille du TGF β sont homodimériques et sont responsables de la formation, au niveau de la cellule cible, d'un complexe tétramérique fait de deux molécules de récepteur I et de deux molécules de récepteur II. Les récepteurs II phosphorylent les récepteurs I qui à leur tour phosphorylent et activent des facteurs de transcription de la famille SMAD (du nom des gènes orthologues *sm* (*Small*) de *Caenorhabditis elegans* et *mad* (*Mothers against decapentaplegic homolog*) de la drosophile. Ces derniers se lient à une molécule commune, SMAD4, pour former, avec une autre protéine SMAD, un complexe d'activation ou de répression transcriptionnelle qui pourra migrer dans le noyau et contrôler la transcription de gènes cibles spécifiques de chacun des couples facteur de croissance-récepteur. Outre la triade facteur de croissance-récepteur I-récepteur II interviennent des corécepteurs indispensables à la génération du signal.

Les ligands de la famille du TGFβ

Le tableau 5-1 recense les principaux facteurs de croissance de la famille du TGFβ, dont le nombre est supérieur à trente. Ces facteurs et leurs récepteurs ont une distribution spatiale et temporelle très variable : certains ne sont exprimés que dans quelques types cellulaires et/ou pendant une brève période de la vie embryonnaire, d'autres sont ubiquistes et/ou exprimés pendant toute la vie de l'individu. Dans la sous-famille du TGFβ, on compte les TGFβ eux-mêmes, au nombre de trois, des protéines nommées activines ou inhibines β, nodal, lefty et myostatine, ainsi que les facteurs GDF (*Growth differentiation factors*) 1 et 3. Dans la sous-famille des BMP, on trouve les BMP 2, 4, 5, 6, 7, 9 et 10, les GDF 5, 6 et 7 et l'AMH (*Anti-Mullerian hormone*) ou MIS (*Mullerian inhibitory substance*).

Tableau 5-1 – Les ligands de la famille du TGFβ et leurs récepteurs.

	Ligand	Récepteur I	Récepteur II	Corécepteur	SMAD
Sous-famille du TGFβ	TGFβ 1, 2, 3	TGFBRI (TβR1, ALK5)	TGFBRII (TβR2)	TGFBRIII (β-glycane)	SMAD2, SMAD3
	Activines A, B, C (INHBA, B, C)	ACVR1A (ALK2) ACVR1B (ALK4)	ACVR2A ACVR2B		
	Myostatine (MSTN, GDF8)	ACVR1B (ALK4)	ACVR2A ACVR2B		
	Nodal	ACVR1B (ALK4) ACVR1C (ALK7)	ACVR2A ACVR2B	Cripto	
	GDF 1, 3	ACVR1B (ALK4) ACVR1C (ALK7)	ACVR2A ACVR2B	Cripto	
	Inhibine (INH A)	ACVR1B (ALK4)	ACVR2A ACVR2B	TGFBRIII (β-glycane)	
	Lefty 1, 2		ACVR2A ACVR2B		
Sous-famille des BMP	BMP 2, 4 GDF 5, 6, 7	BMPRI A (ALK3) BMPRI B (ALK6)	BMPRII ACVR2A ACVR2B	RGMA RGMB	SMAD1, SMAD5, SMAD8
	BMP 6, 7	ACVR1A (ALK2) BMPRI A (ALK3) BMPRI B (ALK6)	BMPRII ACVR2A ACVR2B	RGMA RGMB	
	BMP 9, 10	ACVRL1 (ALK1)	BMPRII	Endogline	
	AMH	BMPRI A (ALK3) ACVR1A (ALK2)	AMHRII		

Ces facteurs sont synthétisés sous la forme de précurseurs (formes latentes) qui sont ensuite soumis à un clivage protéolytique libérant la partie active, C-terminale, de la protéine. Les enzymes protéolytiques chargées de cette activation sont des convertases de la famille des subtilisines comme la furine, appelées PCSK (*Proprotein convertase subtilisin/kexin*) ou PACE (*Paired basic amino acid cleaving enzyme*). Les TGFβ proprement dits restent attachés au peptide N-terminal par des liaisons non covalentes ; les autres facteurs des sous-familles TGFβ et BMP sont sécrétés sous

forme de dimères. Tous ces facteurs de croissance sont caractérisés par la présence de cystéines au niveau C-terminal qui permettent la formation d'un « nœud de cystéines » caractéristique, autorisant la formation de trois ponts disulfure intramoléculaires ; un dernier pont disulfure interchaîne permet leur dimérisation (fig. 5-1).

Tous ces facteurs de croissance sont en effet caractérisés par une structure dimérique antiparallèle, formée préalablement à la liaison aux récepteurs et permettant le recrutement et la dimérisation de deux molécules de récepteurs de type II et de deux molécules de récepteurs de type I (fig. 5-2). Les ligands de la sous-famille du TGF β ont une affinité majeure pour les récepteurs de type II, et ce n'est qu'ensuite que le récepteur I est recruté et fixé à la fois au ligand et au récepteur II. Les ligands de la sous-famille des BMP se lient indifféremment aux deux types de récepteurs et l'interaction se fait essentiellement entre les deux récepteurs. La dimérisation est normalement une homodimérisation ; toutefois, l'hétérodimérisation d'une inhibine α et d'une activine β est possible et le dimère formé est inhibiteur au niveau du recrutement des récepteurs.

Dans le milieu extracellulaire, les ligands des sous-familles TGF β et BMP sont protégés de l'interaction avec leur récepteur par des antagonistes qui sont des protéines sécrétées, chacune étant plus ou moins spécifique d'un des facteurs de croissance de la famille. Certaines sont associées à des glycanes pour former des protéoglycanes (décorine), d'autres sont des analogues structuraux des ligands et les inhibent, sans doute par dominance négative (cerberus, gremline, sclérostine), d'autres encore sont des protéines de liaison dont la diffusion progressive dans l'espace intercellulaire crée des gradients qui jouent un rôle majeur dans les phénomènes morphogénétiques (follistatine, chordine, noggine).

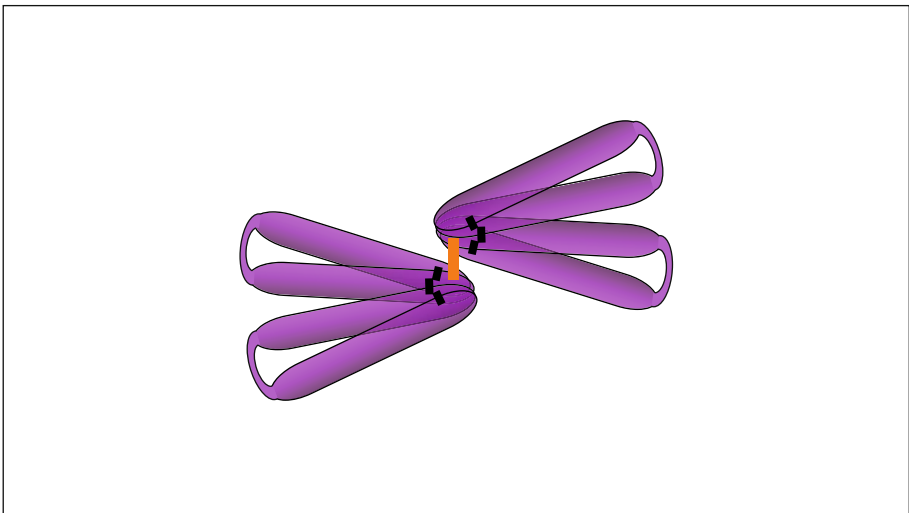


Fig. 5-1 – Représentation schématique d'un dimère de TGF β .

La structure du TGF β présente quatre « doigts » reliés par des ponts disulfure intrachaine (traits noirs) au niveau du « nœud de cystéines » ; deux molécules de TGF β sont associées par un pont disulfure interchaîne (trait orange).

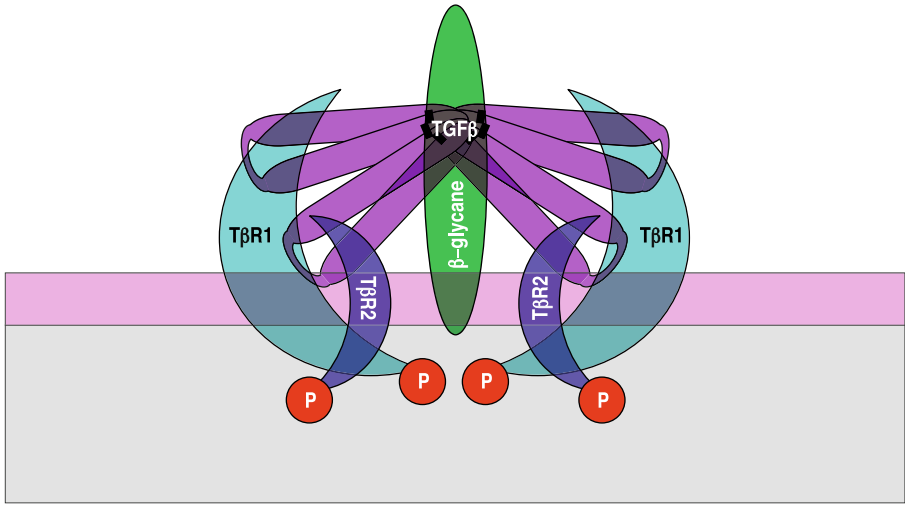


Fig. 5-2 – Le complexe de récepteur du TGFβ.

Représentation schématique du complexe de récepteur comportant le dimère de TGFβ, les deux molécules de récepteur TβR1, les deux molécules de TβR2 et le corécepteur β-glycane.

Les récepteurs et leur activation

Au niveau des cellules cibles de cette voie de signalisation, les récepteurs des ligands des sous-familles TGFβ et BMP sont des protéines membranaires à un seul domaine transmembranaire, avec un domaine extracellulaire destiné à la reconnaissance du ligand et un domaine intracellulaire pourvu d'une activité sérine/thréonine kinase. Ces récepteurs, de structure voisine, sont de deux types, I et II, qui se distinguent en particulier par la présence d'une « boîte glycine-sérine » (*GS box*) dans le domaine juxtamembranaire des récepteurs de type I. De plus, des corécepteurs, qui sont également des protéines membranaires de la cellule réceptrice, sont mis en jeu pour la transduction du signal. Outre la complexité naturelle du système, déjà lourde, s'ajoute la diversité des nomenclatures. Le tableau 5-1 tente de récapituler ces données.

Il existe sept récepteurs de type I, nommés ALK (*Activin receptor-like kinase*), d'ALK1 à ALK7. Le récepteur I des TGFβ est unique ; il se nomme TGFBR1, TβR1 ou ALK5. Les récepteurs I des autres facteurs de la sous-famille TGFβ sont le plus souvent ALK2, ALK4 et ALK7 (ACVR1A, ACVR1B et ACVR1C) et ceux des facteurs de la sous-famille BMP sont le plus souvent ALK3 et ALK6 (BMPR1A et BMPR1B).

Il existe cinq récepteurs de type II ; de la même façon, le récepteur II du TGFβ est unique (TGFBR2 ou TβR2) ; les récepteurs II des facteurs de la sous-famille TGFβ sont les ACVR2A et ACVR2B ; les récepteurs II des facteurs de la sous-famille BMP sont soit les mêmes ACVR2A et ACVR2B, soit le BMPR2.

Il existe un certain nombre de corécepteurs qui ne sont sans doute pas tous identifiés ; ce peut être le β-glycane ou TGFBR3 pour le TGFβ, la protéine cripto pour les facteurs de la sous-famille TGFβ, les protéines RGM (*Repulsive guidance molecule*) A

et B pour les facteurs de la sous-famille BMP et l'endogline (ENG) pour les BMP9 et 10. Les mécanismes de l'action des corécepteurs sur la voie de signalisation sont sans doute variés et nous ne les détaillerons pas ici.

Signalons enfin l'existence de récepteurs leurres, comme la protéine BAMBI (*BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog*), qui présentent une analogie de structure avec les récepteurs de type I, mais ont un domaine intracytoplasmique réduit, dépourvu d'activité kinase ; ces molécules apportent une régulation négative à la voie de signalisation.

La plupart des facteurs de croissance dimériques de la famille TGFβ-BMP se lient dans un premier temps à deux molécules de récepteur de type II qui recrutent ensuite deux molécules de récepteur de type I et les phosphorylent ; c'est l'inverse qui se produit pour BMP2 et 4. Dans tous les cas, le complexe actif est un ensemble hexamérique dont la structure a pu être obtenue à l'état cristallin. La variété des combinaisons possibles explique la variété des messages qui peuvent être transduits par cette voie de signalisation, c'est-à-dire son caractère pléiotrope. La phosphorylation du récepteur de type I se fait au niveau de la *GS box*, en amont du domaine catalytique. Elle entraîne un changement de conformation qui libère le site catalytique sérine/thréonine kinase du récepteur I qui peut alors phosphoryler les protéines SMAD. La protéine FKBP12 (*FK506-binding protein*) se lie à la *GS box* du récepteur I lorsqu'elle n'est pas phosphorylée et empêche l'activation du récepteur en l'absence du signal apporté par le TGFβ.

La transmission du signal apporté par les facteurs de la famille du TGFβ

À la complexité de la combinatoire des facteurs et de leurs récepteurs et corécepteurs s'oppose la relative simplicité des voies de transduction du signal (fig. 5-3). Les facteurs de la sous-famille TGFβ sont responsables de l'activation par phosphorylation des facteurs de transcription SMAD2 et SMAD3 et ceux de la sous-famille BMP des facteurs de transcription SMAD1, SMAD5 et SMAD8. La liaison de ces protéines SMAD « primaires » ou R-SMAD avec la protéine SMAD4 leur permet de migrer dans le noyau où ils pourront reconnaître les séquences des promoteurs de leurs gènes cibles respectifs. Deux protéines de la même famille, SMAD6 et SMAD7, sont des inhibiteurs compétitifs des R-SMAD au niveau des récepteurs activés et empêchent leur phosphorylation. Enfin, il faut noter que la spécificité de l'interaction ligand-récepteur est loin d'être aussi univoque que mentionné plus haut ; c'est ainsi qu'ALK1 peut être recruté par le TGFβ s'il est exprimé en quantité suffisante par la cellule, ce qui conduit à l'activation de facteurs SMAD1, 5 ou 8 au lieu des facteurs SMAD2 ou 3, et donc à des conséquences différentes, voire opposées, au niveau des gènes cibles.

Plusieurs protéines interviennent pour contrôler la phosphorylation des protéines SMAD par les récepteurs ; en particulier la protéine SARA (*SMAD anchor for receptor activation*), qui recrute SMAD2 au niveau du complexe de réception activé et apparaît indispensable à sa phosphorylation. La destruction des complexes de réception

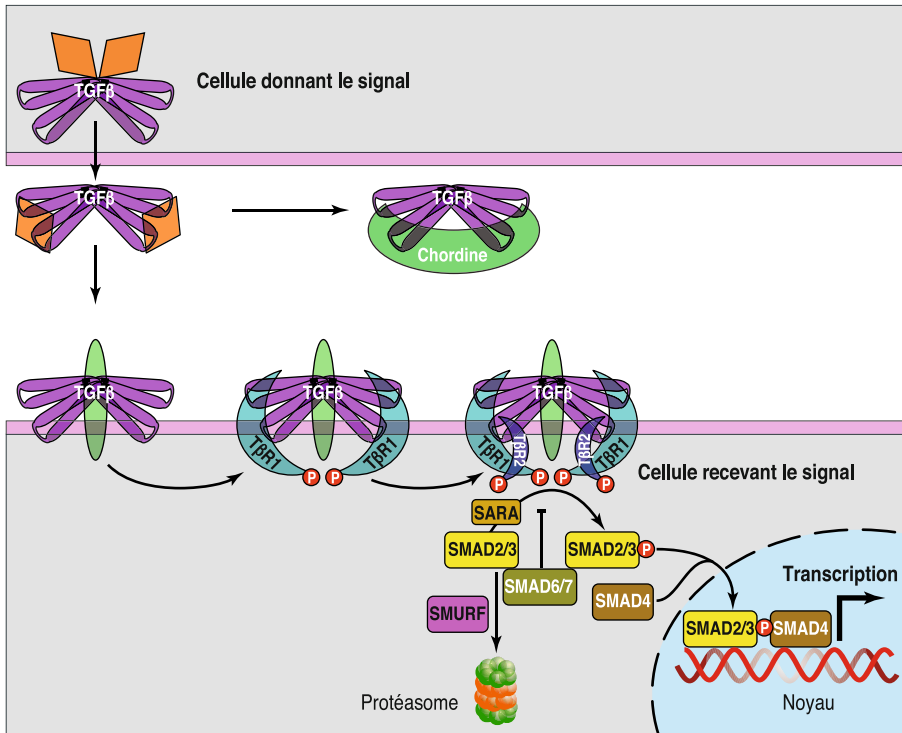


Fig. 5-3 – La voie de signalisation du TGFβ.

Le précurseur du TGFβ est clivé dans le réticulum endoplasmique, mais la partie N-terminale (losanges) reste liée au TGFβ par liaison non covalente. Dans le milieu extracellulaire, il est susceptible d'être inactivé par liaison avec des protéines comme la chordine. Il est reconnu sur une cellule cible par un récepteur de type II, le TβR2 ou TGFBR2 dont il permet la dimérisation et l'autophosphorylation croisée. Le récepteur de type II recrute et phosphoryle deux molécules de récepteur de type I, le TβR1 ou TGFBR1 ou ALK5. Le complexe hexamérique est susceptible de s'associer à un corécepteur comme le β-glycane (TGFBR3) ou l'endogline. Le récepteur de type I est capable de phosphoryler un facteur de transcription SMAD2 ou SMAD3 grâce à l'intervention d'une protéine d'ancrage, SARA. Cette phosphorylation peut être inhibée par une autre protéine SMAD, SMAD6 ou SMAD7. Le facteur de transcription phosphorylé est associé à SMAD4 pour migrer dans le noyau, reconnaître des coactivateurs ou des corépresseurs et présider à la transcription de très nombreux gènes cibles. Les protéines SMAD peuvent être entraînées vers le protéasome par une ubiquitine ligase, SMURF.

est assurée par endocytose et destruction par le protéasome après action d'une E3 ubiquitine ligase (voir Annexe C) qui est nommée SMURF (*SMAD ubiquitination regulating factor*).

Les protéines SMAD possèdent deux domaines fonctionnels, les domaines MH1 (*MAD homology domain 1*) et MH2 (*MAD homology domain 2*), séparés par un domaine de liaison riche en proline. Le domaine MH1 est responsable de la liaison

avec l'ADN, mais le domaine possédant l'activité transcriptionnelle est MH2, qui est également responsable des interactions entre protéines SMAD. Ce domaine contient la séquence SSXS qui est la cible de la phosphorylation par les récepteurs ALK. Cette phosphorylation induit un changement de conformation qui libère le domaine MH2 du domaine MH1, ce qui permet l'activation de la voie. Les facteurs de transcription SMAD recrutent des coactivateurs et des corépresseurs transcriptionnels, de telle sorte que, selon le contexte (c'est-à-dire la nature des protéines nucléaires disponibles dans une cellule donnée à un moment donné), le stimulus TGFβ peut activer ou réprimer la transcription de nombreux gènes différents.

En dehors de la voie canonique de signalisation, qui passe par l'activation des protéines SMAD, les facteurs de croissance de la famille du TGFβ sont capables d'activer la voie des MAP kinases (chapitre 2), vraisemblablement en agissant au niveau des MAP3K comme TAK1 (MAP3K7), et cela aussi bien pour la voie ERK que pour la voie p38 et la voie JNK. À l'inverse, les facteurs de transcription SMAD peuvent être phosphorylés par les MAP kinases, en particulier ERK, sur des sites qui peuvent entraîner leur activation ou leur inhibition selon les cas.

Altérations oncogéniques

Les voies induites par le TGFβ et ses analogues ont de multiples rôles dans le développement et la morphogenèse, et les mutations des gènes impliqués sont à l'origine de nombreuses pathologies héréditaires et de malformations congénitales. Leurs rôles dans l'oncogenèse sont complexes et contradictoires. La voie du TGFβ est plutôt une voie anti-oncogénique dans les étapes précoces, car elle s'oppose à la prolifération et induit la différenciation et l'apoptose ; mais dans les étapes tardives, elle joue un rôle favorisant l'invasion et la métastase par son action au niveau de l'adhésion cellulaire, du microenvironnement tumoral, de l'angiogenèse et de la surveillance immunitaire.

Dans la plupart des études, les acteurs de la voie du TGFβ apparaissent comme des suppresseurs de tumeurs. Des mutations invalidantes de BMPR1A (ALK3), de SMAD4, et plus rarement de l'endogline, ont été rencontrées dans des syndromes de prédisposition aux cancers digestifs (syndrome de polypose juvénile). Par ailleurs, certains polymorphismes fonctionnels des TGFβ et de leurs récepteurs s'accompagnent d'une augmentation de la susceptibilité à certains cancers. Les métastases des cancers du sein et du poumon s'accompagnent fréquemment de la perte du gène TGFBR3. Des mutations de TGFBR2 et de SMAD4 sont rencontrées dans les cancers du côlon, du pancréas et du poumon. Les mutations de TGFBR2 sont liées à la présence d'un microsatellite dans la séquence codante, qui est fréquemment muté en cas d'instabilité microsatellitaire, dans les cancers sporadiques comme dans les cancers du côlon à prédisposition héréditaire. Une perte d'expression de TGFBR2 a été observée dans de nombreuses tumeurs humaines de divers types.

Le rôle positif du TGFβ sur la formation des métastases a été mis en évidence expérimentalement : l'inhibition de l'activité kinase du TGFBR1 inhibe la formation des métastases pulmonaires de tumeurs mammaires xénogreffées chez la souris *nude*.

Un tel rôle est fortement suspecté dans les cancers humains, car le TGF β est un inducteur puissant de la transition épithélio-mésenchymateuse, par l'intermédiaire de l'action de SMAD sur l'expression des gènes SNAIL, SLUG et TWIST.

Cibles pharmacologiques

Le ciblage de la voie du TGF β est à concevoir avec circonspection en raison du double effet sur cette voie, qui schématiquement inhibe la prolifération et stimule la dissémination métastatique. Des inhibiteurs macromoléculaires du TGF β (anticorps monoclonaux, oligonucléotides antisens, récepteurs solubles, protéoglycanes de séquestration) ont fait l'objet d'études précliniques et d'essais cliniques dans les glioblastomes et les mélanomes en particulier. Des petites molécules inhibitrices de l'activité kinase des récepteurs ALK ont été développées avec, comme il est habituel dans cette classe pharmacologique, des possibilités d'action croisée sur de multiples kinases comme la MAP kinase p38. Toutefois, des molécules assez spécifiques d'ALK5 (TGFB β R1) ont été obtenues, avec un effet inhibiteur de la transition épithélio-mésenchymateuse dans des modèles précliniques. L'inhibition de la voie du TGF β , outre un effet attendu sur la dissémination métastatique, peut conduire également à une stimulation de l'immunogénicité tumorale et participer ainsi à un effet thérapeutique.

Les protéines SMAD sont beaucoup plus difficiles à cibler. Des aptamères susceptibles d'inhiber les domaines actifs de ces protéines ont été développés et semblent fonctionnels *in vitro*.

Bibliographie

- de Caestecker M. (2004) The transforming growth factor- β superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*; 15: 1-11.
- Dong M, Blobel GC. (2006) Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood*; 107: 4589-96.
- Gordon KJ, Blobel GC. (2008) Role of transforming growth factor-superfamily signalling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta*; 1782: 197-228.
- Heldin CH, Landström M, Moustakas A. (2009) Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current Opin Cell Biol*; 21: 166-76.
- Leivonen SK, Kähäri VM. (2007) Transforming growth factor- β signaling in cancer invasion and metastasis. *Int J Cancer*; 121: 2119-24.
- Levy L, Hill CS. (2006) Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*; 17: 41-58.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D. (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev*; 19: 2783-810.
- Massagué J. (2008) TGF β in cancer. *Cell*; 134: 215-30.
- Rahimi RA, Leof EB. (2007) TGF- β signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem*; 102: 593-608.
- Shi Y, Massagué J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*; 113: 685-700.
- Zavadil J, Böttlinger EP. (2005) TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*; 24: 5764-74.

Chapitre 6

Les voies des récepteurs couplés aux protéines G

Introduction

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) constituent une immense classe de récepteurs membranaires pour de multiples hormones, neurotransmetteurs et facteurs divers. Une large partie de la pharmacologie cardio-vasculaire et neurologique repose sur la connaissance de ces récepteurs et sur la recherche de molécules d'intérêt thérapeutique susceptibles d'interférer avec eux, de façon agoniste ou antagoniste. Nous ne ferons dans ce chapitre qu'effleurer ce vaste domaine pour nous concentrer sur quelques-uns de ces récepteurs, ceux ayant une relation possible avec l'oncogenèse. Nous présenterons dans un premier temps le fonctionnement global de ces récepteurs et les phénomènes principaux résultant de leur activation. Nous présenterons ensuite une famille de tels récepteurs et de leurs ligands susceptibles d'être impliqués dans l'oncogenèse, la famille des chimiokines.

De façon générale, le fonctionnement de ces récepteurs implique l'activation de complexes hétérotrimériques appelés protéines G, capables de se lier au GTP et de l'hydrolyser. Ces protéines activent alors des enzymes membranaires productrices de seconds messagers (AMP cyclique, diacylglycérol, inositol triphosphate, Ca^{2+}) qui exercent de nombreuses fonctions intracellulaires.

Structure et mécanisme d'action des récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs

Les GPCR sont constitués d'une chaîne polypeptidique continue pourvue de sept domaines transmembranaires ; ces domaines contiennent une série de vingt-deux à vingt-cinq acides aminés hydrophobes qui permettent la formation d'une hélice alpha insérée entre les chaînes aliphatiques des phospholipides membranaires. La partie N-terminale des récepteurs est extracellulaire, leur partie C-terminale intracellulaire et

trois boucles séparant les domaines transmembranaires sont présentes à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule. La chaîne polypeptidique « serpente » ainsi dans la membrane, d'où le nom de récepteurs serpentins (*serpentine receptors*) qui leur est parfois donné. Le nombre de ces récepteurs est considérable, supérieur à huit cents, ce qui représente une fraction importante du génome ; il en existe de nombreuses sous-familles en fonction de leur structure, de leurs ligands et du type de liaison qu'ils peuvent contracter avec eux. On peut ainsi distinguer, de façon simplificatrice :

- la famille de la rhodopsine, la plus abondante (672 membres). Ce sont des récepteurs de petites molécules à fonction de messagers intercellulaires : acétylcholine, catécholamines et amines biogènes, nucléosides et nucléotides, rétinol, prostaglandines et leucotriènes, mais aussi d'hormones protéiques (ACTH, gonadotrophines, TSH) et peptidiques (ocytocine, angiotensine, somatostatine) et de chimiokines. La liaison entre ligand et récepteur implique les structures transmembranaires profondes des récepteurs. Certains de ces récepteurs sont activés par protéolyse par la thrombine ou la trypsine qui clivent une partie de l'extrémité N-terminale du récepteur qui se comporte ensuite comme un ligand autonome. On les appelle les récepteurs PAR (*Protease-activated receptors*).
- la famille des récepteurs de la sécrétine (quinze membres) comprenant les récepteurs de diverses hormones polypeptidiques : glucagon, parathormone, calcitonine, *releasing factors* hypothalamiques (CRH, FRH, LRH, TRH). La liaison entre ligand et récepteur fait intervenir les domaines transmembranaires et la partie N-terminale du récepteur ;
- la famille des récepteurs du glutamate (vingt-deux membres) qui comprend des récepteurs métabotropes (par opposition aux récepteurs ionotropes, chapitre 15) de divers neurotransmetteurs (glutamate, GABA) qui se lient au récepteur au niveau de sa partie N-terminale. Elle comprend aussi un « senseur » du calcium Ca^{2+} ; le calcium se lie au niveau d'une extension de la partie N-terminale qui vient ensuite interagir avec les domaines transmembranaires profonds et se comporte comme un « autoligand ».
- la famille *Adhesion* (trente-trois membres) dont les récepteurs ont un volumineux domaine N-terminal leur permettant d'interagir avec de nombreuses molécules extracellulaires, mais dont les ligands semblent être principalement des protéoglycannes ;
- la famille des récepteurs *Frizzled* (FZL), qui comprend les onze récepteurs des protéines WNT (chapitre 7) et le récepteur secondaire de la voie Hedgehog, appelé *Smoothened* (SMO) (chapitre 9). Ces récepteurs présentent des analogies structurales avec les GPCR et pourraient agir également en activant des protéines G hétérotrimériques.

Dans tous les cas, la liaison du ligand au récepteur induit un changement de conformation qui est à l'origine du message transmis. On peut considérer que les récepteurs existent sous deux formes, une forme inactive et une forme active, et que leurs ligands stabilisent, selon les cas, l'une ou l'autre forme. Un certain nombre de récepteurs sont actifs après dimérisation (homodimères ou hétérodimères), mais il ne semble pas que ce soit le cas général.

Les protéines G

La voie finale commune de l'activation des GPCR est la mise en jeu de protéines G hétérotrimériques. Les protéines G sont des molécules capables de lier le GTP (Guanosine triphosphate) et de l'hydrolyser : ce sont donc des GTPases. On distingue les « protéines G hétérotrimériques », qui nous intéressent ici, et les « petites protéines G » comme RAS étudiée dans le chapitre 2. Les protéines G hétérotrimériques sont faites de trois chaînes polypeptidiques associées, appelées α , β et γ . Les chaînes β et γ sont étroitement liées et forment une seule entité $\beta\gamma$. Elles sont ancrées dans la membrane par un substituant lipidique attaché, après traduction, au niveau N-terminal de la sous-unité α (groupement myristoyl ou palmitoyl) et au niveau C-terminal de la sous-unité γ (groupement farnésyl ou géranylgeranyl). La sous-unité α contient un domaine de liaison des nucléotides guanyliques, qui est occupé par le GDP à l'état basal. Les protéines G hétérotrimériques sont associées de façon stable avec une enzyme effectrice et peuvent s'associer de façon transitoire avec un GPCR.

C'est la liaison du récepteur avec son ligand qui provoque cette association transitoire avec une protéine G, et cette association entraîne le remplacement du GDP par le GTP au niveau de la sous-unité α . Celle-ci se détache alors du récepteur et de la sous-unité $\beta\gamma$, puis réalise le clivage du GTP en GDP grâce à son activité GTPasique. Pendant la période brève où la sous-unité α est liée au GTP, l'enzyme effectrice qui lui est associée est activée (parfois inhibée) et peut exercer (ou ne peut plus exercer) sa fonction catalytique ; dès que le GTP est clivé, cette régulation cesse et l'enzyme effectrice revient à son état basal. De même, la sous-unité $\beta\gamma$ libre peut activer d'autres effecteurs avant de se réassocier à la sous-unité α liée au GDP. Les protéines G fonctionnent donc comme des interrupteurs donnant un signal et un seul ; elles doivent à nouveau s'associer à un récepteur activé et échanger leur GDP contre du GTP pour donner une nouvelle impulsion à leurs effecteurs. La figure 6-1 présente le schéma d'activation des protéines G hétérotrimériques.

Face aux centaines de récepteurs, il existe un total de seize gènes codant pour des sous-unités α , cinq pour des sous-unités β et douze pour des sous-unités γ de protéine G. Les sous-unités α déterminent la diversité tissulaire et fonctionnelle des protéines G, alors que les sous-unités $\beta\gamma$ sont plutôt impliquées dans le contrôle de l'activité de ces protéines. Il existe plusieurs types de sous-unités α , nommées α_i , α_s , α_q et α_{12} , qui diffèrent en fonction de l'effecteur qu'elles activent : la sous-unité α_s liée au GTP active l'adénylate cyclase (ADCY) et la sous-unité α_i l'inhibe ; la sous-unité α_q liée au GTP active la phospholipase C bêta (PLC β). Ces enzymes permettent la production de seconds messagers, intermédiaires communs des signaux apportés par les ligands des GPCR. La sous-unité $\beta\gamma$, détachée transitoirement de la sous-unité α , a également des effecteurs qui lui sont propres, en particulier la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ) (voir p. 97) ainsi que des canaux ioniques.

L'activité des protéines G hétérotrimériques est régulée par des protéines RGS (*Regulator of G protein signaling*) qui stimulent l'activité GTPasique des protéines G et sont donc des GAP (*GTPase activating proteins*). Elles ont par conséquent une fonc-

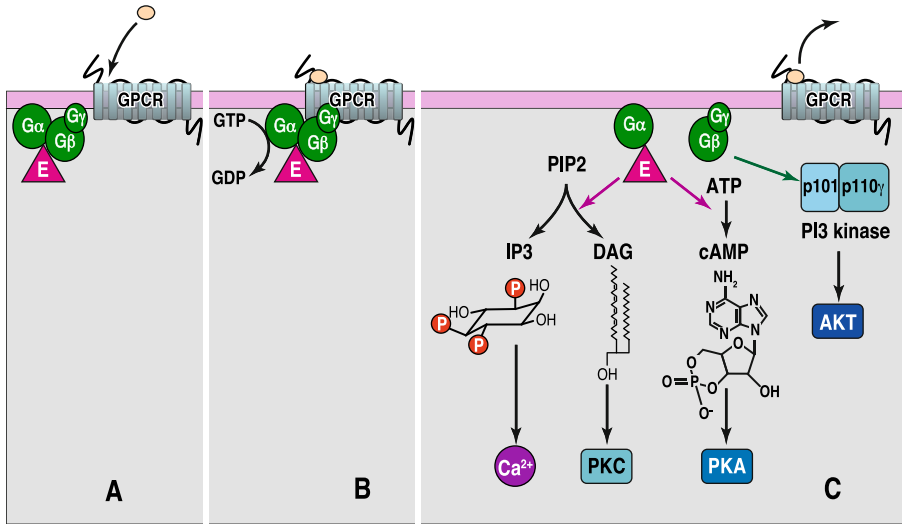


Fig. 6-1 – Activation et fonction des protéines G hétérotrimériques.

À l'état basal (A), le récepteur à sept domaines transmembranaires et le complexe de la protéine G hétérotrimérique sont dissociés ; la sous-unité α est liée au GDP et à son enzyme effectrice (adénylyl cyclase ou PLC β). Lors de l'arrivée d'un ligand (B), le récepteur et le complexe G $\alpha\beta\gamma$ s'associent transitoirement ; la sous-unité α échange son GDP contre du GTP. À l'état actif (C), la sous-unité α est liée au GTP ; elle se dissocie du récepteur et du complexe $\beta\gamma$ et active l'enzyme effectrice. Il y a formation de cAMP par l'adénylyl cyclase et de DAG et d'IP3 par la PLC β , ce qui entraîne entre autres l'activation de la PKA par le cAMP et de la PKC par le DAG. La sous-unité $\beta\gamma$ est capable d'activer la sous-unité p101 de la PI3 kinase γ qui pourra activer la kinase AKT.

tion de désactivation des protéines G qu'elles ramènent à leur état inactif, liées au GDP. Il existe une vingtaine de protéines RGS de spécificité variable à l'égard des protéines G. Les protéines G hétérotrimériques peuvent également être régulées par phosphorylation : la sous-unité $\beta\gamma$ est capable de recruter une kinase GRK (*GPCR kinase*) qui phosphoryle le récepteur activé et accélère sa désensibilisation en créant un site de reconnaissance pour une β -arrestine qui l'internalise.

Les seconds messagers de l'activation des GPCR

Adénylyl cyclases et AMP cyclique (cAMP)

Les adénylyl cyclases sont des enzymes membranaires de poids moléculaire élevé, faites de deux parties homologues contenant chacune un domaine fait de six hélices transmembranaires et un domaine intracellulaire C-terminal important (domaine C). Les deux domaines C sont associés et offrent un site de liaison à l'ATP et un site catalytique pour sa transformation en cAMP. Ces enzymes sont sous le contrôle des

protéines G hétérotrimériques : celles possédant une sous-unité α_s activent l'adénylyl cyclase lorsqu'elles sont liées au GTP, et celles possédant une sous-unité α_i inhibent l'adénylyl cyclase. Elles sont également sous le contrôle de multiples facteurs qu'elles intègrent : Ca^{2+} , phosphorylation par une protéine kinase C, etc.

Le cAMP (fig. 6-2) est le second messenger de l'action d'un grand nombre de signaux reçus par les GPCR : hormones, neurotransmetteurs, etc. Il intervient dans la régulation de nombreuses enzymes, en particulier dans le cadre du métabolisme intermédiaire. La cible du cAMP est la protéine kinase A (PKA), une sérine/thréonine kinase tétramérique, faite de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités régulatrices. L'activation de la PKA par le cAMP est coopérative, ce qui permet un effet rapide et ample, rapidement terminé par le fait que la PKA phosphoryle et active la cAMP-phosphodiesterase qui hydrolyse le cAMP. La PKA a pour cibles de nombreuses protéines dont les mieux identifiées sont la glycogène phosphorylase kinase, qu'elle active, et la glycogène synthase, qu'elle désactive. La PKA exerce également un effet majeur sur la transcription des gènes, en phosphorylant et en activant un facteur de transcription (voir Annexe B) nommé CREB (*cAMP responsive element binding protein*) qui migre dans le noyau et reconnaît des séquences nucléotidiques dans le promoteur de gènes cibles, séquences appelées CRE (*cAMP responsive element*). Le cAMP est également capable d'activer directement la protéine EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*), un facteur d'échange GDP-GTP d'une petite protéine G, RAP, à l'origine d'autres voies de signalisation intracellulaire.

Phospholipases C, diacylglycérol et inositol triphosphate

Les phospholipases C sont des enzymes membranaires possédant un domaine PH (*Pleckstrin homology domain*) qui leur permet de reconnaître les phosphoinositides. Alors que les PLC γ peuvent être activées par un RTK (chapitre 1), les PLC β sont activées par un GPCR via l'action des protéines G hétérotrimériques possédant une sous-unité α_q . Elles agissent sur le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate et génèrent une molécule lipidique, le diacylglycérol (DAG) et une molécule hydrosoluble, l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) (fig. 6-2). Ces deux molécules sont les seconds messagers de l'action de nombreux ligands des GPCR.

Le DAG est le principal activateur physiologique des protéines kinases C (PKC). Cette famille de douze sérine/thréonine kinases, d'expression variable selon les tissus, possède de nombreux substrats que les isoformes traitent avec assez peu de spécificité, et exerce de nombreux effets intracellulaires. Avant d'être activée par le DAG, la PKC doit être phosphorylée par une kinase PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase*), puis s'autophosphoryler sur deux sites distincts. L'interaction avec le DAG lui permet de s'ancrer dans la membrane et d'exercer son activité catalytique. Plusieurs autres composés lipidiques, produits par des phospholipases autres que la PLC, en particulier les phospholipases A2 et D, ainsi que la sphingomyélinase, sont également susceptibles d'activer les PKC : acide lysophosphatidique (LPA), acide arachidonique, sphingosine, etc. Les PKC sont susceptibles de se lier à de nombreuses protéines qui dirigent ainsi son action vers des cibles subcellulaires précises : protéines STICK

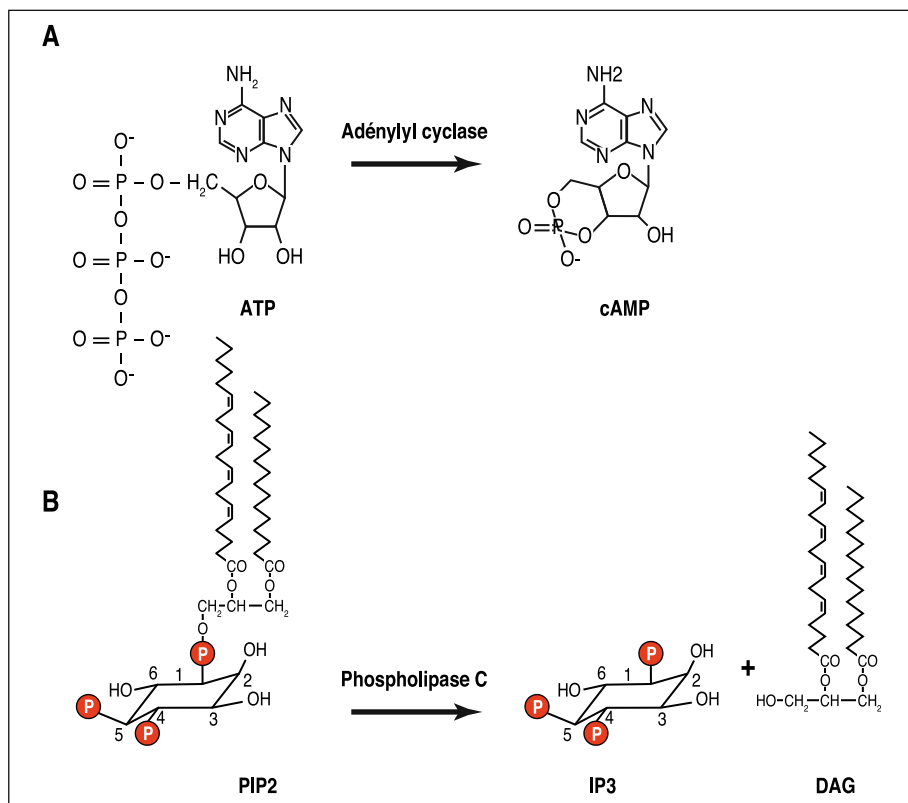


Fig. 6-2 – Formation des seconds messagers.

A. L'adénylyl cyclase convertit l'ATP en AMP cyclique (cAMP).

B. La phospholipase C hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG).

(*Substrates that interact with C-kinase*) comme la vinculine, la taline ou l'annexine, protéines PICK (*Proteins interacting with C-kinase*), protéines RACK (*Receptors for activated C-kinase*). Ces protéines jouent des rôles importants dans l'adhésion cellulaire, la polarité, les contacts intercellulaires, et expliquent les multiples actions des PKC dans ces phénomènes.

L'IP3 est un des principaux responsables de la mobilisation du Ca^{2+} à partir de compartiments de stockage intracellulaire vers le cytosol. La concentration du Ca^{2+} dans le cytosol est très faible (de 0,05 à 0,1 μM) et des pompes ATPasiques Ca^{2+} -dépendantes le chassent continuellement vers le milieu extracellulaire ou le réticulum endoplasmique. L'IP3 permet sa mobilisation rapide, grâce à la mise en jeu de récepteurs de l'IP3 (IP3R ou ITPR) présents à la surface des membranes du réticulum endoplasmique. Ces récepteurs sont des canaux calciques tétramériques dont chaque composant est une protéine à six domaines transmembranaires, dont les deux extrémités sont cytosoliques (voir chapitre 15). La partie N-terminale possède le site de liaison de l'IP3 ainsi que de nombreux sites de régulation. Ces récepteurs sont activés

par l'augmentation de la concentration locale en Ca^{2+} , ce qui réalise un rétrocontrôle positif appelé CICR (*Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release*), mais leur sensibilité au Ca^{2+} diminue progressivement et ils sont rapidement désactivés.

Le Ca^{2+} intervient dans de nombreux processus cellulaires (voir chapitre 15). Le fait qu'il soit un cation divalent explique pourquoi il est capable de se lier à deux charges négatives portées par des protéines ou d'autres macromolécules et de jouer un rôle majeur au niveau de l'adhésivité cellulaire. La plupart des effets du Ca^{2+} découlent de l'association entre Ca^{2+} et une petite protéine, la calmoduline. L'activité de nombreuses protéines est modulée par le complexe Ca^{2+} -calmoduline (et par conséquent par la disponibilité en Ca^{2+}), en particulier des protéines impliquées dans la signalisation, comme les PKC, les PLC, l'adénylyl cyclase, la phosphodiesterase, la NO synthase, etc. D'autres protéines possèdent des sites de liaison du Ca^{2+} et peuvent être directement activées par cet ion : ce sont en particulier des protéines du cytosquelette impliquées dans le maintien de la forme et dans la motilité cellulaires.

Connexions avec d'autres voies de signalisation

La voie des MAP kinases et la voie de la PI3 kinase peuvent être mises en jeu de diverses façons à la suite de l'activation de GPCR (chapitres 2 et 3). La PKA (activée par le cAMP) est capable de jouer le rôle de MAP4K et de phosphoryler certaines MAP3K (fig. 2-3) comme B-RAF, initiant un module de la voie des MAP kinases. La PKC (activée par le DAG) est capable de phosphoryler la JUN N-terminal kinase (JNK) dans un autre module de cette voie. Le DAG est en outre capable, conjointement avec le Ca^{2+} , d'activer une protéine d'échange du GTP pour la protéine RAS (RASGRP1), ouvrant un module MAP kinase au niveau de l'appareil de Golgi (fig. 2-3). Des sous-unités régulatrices de la phosphatidylinositol-3-kinase gamma (PI3K γ), nommées p101 (PIK3R5) et p84 (PIK3R6), sont également susceptibles d'être activées par une protéine G hétérotrimérique, par l'intermédiaire de la sous-unité $\beta\gamma$, conduisant à la production de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate et à l'activation de la voie AKT (fig. 3-1).

L'activation des GPCR peut mettre en route l'activation de protéines d'échange GDP-GTP de petites protéines G autres que RAS. C'est le cas pour RAP, par l'intermédiaire du cAMP qui active le facteur EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*) et, *via* la sous-unité α_{12} de protéines G hétérotrimériques, pour des GEF activant RHO, RAC et CDC42. L'activation de ces petites protéines G conduit à de multiples actions intracellulaires, au niveau de la prolifération, du cytosquelette, de la motilité, de la polarité et de l'adhésion cellulaires (fig. 6-3). Le mécanisme d'activation des GEF par les sous-unités α de protéines G hétérotrimériques n'est pas entièrement élucidé, mais semble faire intervenir une interaction directe. Toutes ces interconnexions montrent que les voies activées par les GPCR participent à la prolifération cellulaire et expliquent pourquoi des analogues pharmacologiques du DAG, les esters de phorbol, exercent un effet cocancérogène de promotion du développement tumoral.

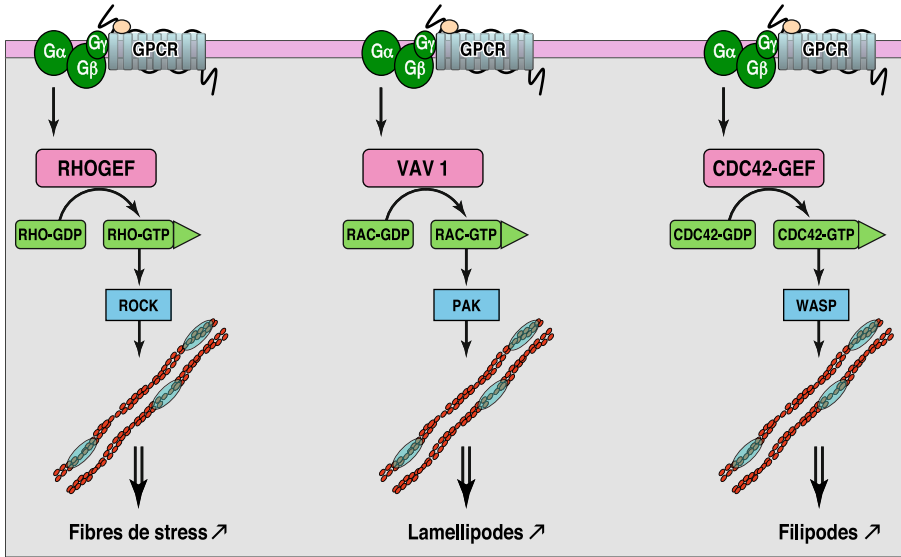


Fig. 6-3 – Quelques voies de signalisation en aval de l'activation des GPCR.

Quelques-unes des voies d'activation et de signalisation de petites protéines G en réponse à l'activation d'un GEF par une protéine G hétérotrimérique. A.

Altérations oncogéniques et cibles thérapeutiques

Les voies mises en jeu par l'activation des GPCR ne sont pas fréquemment altérées dans les cancers comme les voies mises en jeu par l'activation des RTK (chapitres 1-3). Il est toutefois intéressant de rechercher et de décrire de telles altérations qui peuvent servir de cibles à des approches thérapeutiques innovantes. Nous avons évoqué dans le paragraphe précédent le fait que, de façon générale, les voies activées par les GPCR pouvaient concourir à la prolifération cellulaire avec, en particulier, le rôle promoteur de tumeurs de la PKC, *via* son activation pharmacologique par les esters de phorbol. Plusieurs altérations spécifiques de ces voies peuvent être signalées pour leur contribution à l'oncogenèse. Le cas particulier des chimiokines et de leurs récepteurs sera évoqué dans le paragraphe suivant.

Un certain nombre de ligands sont des facteurs mitogènes : la thrombine, l'acide lysophosphatidique (LPA), la sphingosine-1-phosphate (S1P), le GRP (*Gastrin-releasing peptide*), l'endothéline et les prostaglandines stimulent la prolifération cellulaire par activation de leurs GPCR respectifs ; ils sont surexprimés dans certains cancers, mais leur rôle moteur de l'oncogenèse est difficile à affirmer. Cette action sur la prolifération peut être réalisée par l'activation de la PKC ou des voies de prolifération classiques (voies des MAP kinases, voie de la PI3 kinase) interconnectées avec les voies activées par les GPCR *via* des petites protéines G.

Au niveau des récepteurs, MAS1, apparenté aux récepteurs de l'angiotensine, a été décrit comme un oncogène, sans que des mutations aient pu être décelées. Les seules mutations oncogéniques décrites concernent les récepteurs de la TSH (*Thyroid stimulating hormone*), de la FSH (*Folliculin stimulating hormone*) et de la cholécystokinine (CCK) dans les cancers de la thyroïde, de l'ovaire, et du côlon, respectivement. En revanche, un certain nombre de GPCR de facteurs mitogènes sont surexprimés dans les cancers : c'est le cas des récepteurs de S1P et de LPA, ainsi que des récepteurs PAR : le récepteur de la thrombine, F2A, est fortement surexprimé dans les cancers invasifs de divers organes. Les cancers du poumon à petites cellules et, de façon générale, les tumeurs endocrines pourraient être entretenus par l'activation paracrine ou autocrine des nombreux récepteurs des peptides qu'ils produisent en excès (bombésine ou GRP, bradykinine, neuromédine B [NMB], cholécystokinine [CCK], galanine, neurotensine, vasopressine). Il en est de même pour les tumeurs carcinoïdes sécrétant des substances vasomotrices. Une activation des récepteurs de l'endothéline, de la bradykinine, du GRP et de l'angiotensine est rencontrée dans les cancers de la prostate. On peut faire l'hypothèse qu'une action thérapeutique visant ces récepteurs ou leurs ligands pourrait se révéler efficace dans ces cancers, peu fréquents mais particulièrement meurtriers.

Au niveau des protéines G hétérotrimériques, il a été montré expérimentalement que des mutations de nombreuses sous-unités α pouvaient être oncogéniques. Toutefois, seules quelques mutations oncogéniques ont été décrites dans les cancers humains ; elles affectent l'activité GTPasique de sous-unités α_s et α_{12} dans des tumeurs thyroïdiennes, surrénales et hypophysaires.

La voie des chimiokines

Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines (en anglais *chemokines*) constituent une classe de petites protéines de huit à quinze kDa caractérisées par la présence de quatre cystéines et de deux ponts disulfure. Les deux premières cystéines sont soit consécutives (chimiokines CCL), soit séparées par un acide aminé (chimiokines CXCL) (fig. 6-4) ; il existe en outre deux types plus rares (CX3CL et XCL). Les récepteurs des chimiokines sont des GPCR répartis en trois sous-familles selon la structure des chimiokines qu'ils reconnaissent. La correspondance entre chimiokines et récepteurs est complexe ; les récepteurs sont désignés selon la même règle que les ligands (CCR, CXCR, XCR et CX3CR). Un total de quarante-six chimiokines susceptibles d'activer dix-huit récepteurs a été identifié.

Il existe pour cette voie de signalisation un caractère pléiotrope important, chaque chimiokine pouvant avoir de multiples effets intracellulaires, et une redondance élevée, chaque récepteur étant susceptible d'être activé par plusieurs ligands. Les chimiokines président aux migrations de nombreux types cellulaires, tout particulièrement les lymphocytes, par chimiotactisme, en attirant les cellules dotées des récepteurs correspondants. Les chimiokines sont des médiateurs de l'inflammation, les

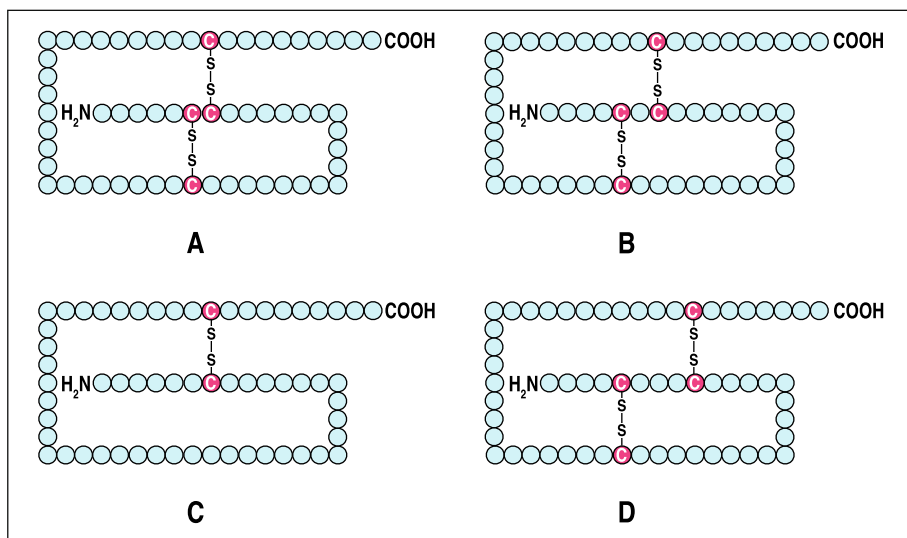


Fig. 6-4 – Représentation schématique de chimiokines de type CCL (A), CXCL (B), XCL et CX3CL.

La chaîne polypeptidique contient deux cystéines adjacentes (CC) ou séparées par un acide aminé (CXC) ou par 3 acides aminés (CX3C) qui forment, avec deux autres cystéines distales, deux ponts disulfure intramoléculaires. Un seul pont disulfure est présent dans les chimiokines XCL.

CXCL étant responsables du recrutement des neutrophiles et les CCL de celui des macrophages au niveau des sites inflammatoires. Il est important de noter que deux récepteurs de chimiokines, CXCR4 et CCR5, sont responsables de l'entrée du virus HIV dans les cellules T et les macrophages, contribuant ainsi de façon majeure à l'infection par ce virus. Les chimiokines exercent également des effets sur l'immunité et sur la migration des cellules tumorales.

La signalisation par les chimiokines

Le type de signalisation induite par les chimiokines ne se distingue pas du type de signalisation induite par les ligands des GPCR : elle met en jeu des protéines G hétérotrimériques et des enzymes effectrices, au premier rang desquelles l'adénylate cyclase, la phospholipase C et les protéines d'échange GDP-GTP de petites protéines G. Les cibles ultimes de cette signalisation sont les protéines d'adhésion cellulaire et les protéines du cytosquelette impliquées dans la motilité cellulaire. Elles expliquent les phénomènes de chimiotactisme qui sont mis en jeu par le couplage entre une chimiokine et son récepteur. Les chimiokines, sécrétées dans l'espace intercellulaire autour d'une cellule source, vont se fixer sur les récepteurs de cellules cibles circulantes comme les lymphocytes. Ces cellules vont pouvoir, à ce niveau, exercer les fonc-

tions mises en jeu par l'activation du récepteur. Ce phénomène n'est pas exclusif des cellules du système immunitaire où il a été découvert en premier lieu : l'action des chimiokines s'exerce à de multiples niveaux : angiogenèse, développement, etc.

Altérations oncogéniques

Les chimiokines sont associées à de nombreux phénomènes immunopathologiques, relevant de l'infectiologie, de la pneumologie ou de la rhumatologie. En oncologie, les chimiokines sont impliquées dans les phénomènes métastatiques. Un premier rôle des chimiokines exprimées, parfois fortement, par les cellules tumorales, est de recruter des lymphocytes et des macrophages au niveau de la tumeur, entretenant un état inflammatoire chronique. Une chimiokine impliquée dans le recrutement des macrophages est RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) ou CCL5. L'activation des macrophages entraîne la production de métalloprotéinases (MMP) dont l'activité est capitale pour le développement des métastases, car elles hydrolysent la matrice conjonctive du stroma tumoral. Une autre chimiokine tumorale, CXCL12 ou SDF1 (*Stromal cell-derived factor 1*), est capable de recruter des cellules endothéliales concourant au développement de nouveaux vaisseaux (angiogenèse), car les progéniteurs de ces cellules expriment le récepteur du SDF1, CXCR4.

Un deuxième aspect concerne l'activité des chimiokines sur la motilité des cellules tumorales, grâce aux récepteurs de chimiokines qu'elles expriment souvent à un niveau élevé, comme CXCR4 et CCR7. L'activation de ces récepteurs leur permet de sécréter également des métalloprotéinases. Par ailleurs, la chimiokine CXCL12, qui reconnaît le récepteur CXCR4, est fortement exprimée dans le poumon, le foie et la moelle osseuse, ce qui suggère qu'elle puisse être responsable de la métastase des cellules cancéreuses dans ces organes ; la chimiokine CCL21 ou ECL (*Efficient chemoattractant for lymphocytes*), qui est le ligand principal du récepteur CCR7, est en revanche fortement exprimée dans les ganglions lymphatiques et y attirerait les cellules cancéreuses.

Enfin, l'activation des récepteurs des chimiokines des cellules tumorales est susceptible de favoriser leur multiplication : on a vu plus haut que les GPCR étaient susceptibles d'activer la voie de la PI3 kinase et certains modules de la voie des MAP kinases.

Cibles pharmacologiques

Plusieurs laboratoires sont impliqués dans le développement de molécules dirigées soit contre les chimiokines elles-mêmes, soit contre leurs récepteurs. Cette recherche profite du fait que les chimiokines sont impliquées dans de nombreuses pathologies et intéressent donc plusieurs champs thérapeutiques. Toutefois, les difficultés liées à la redondance des diverses chimiokines et à leurs effets pléiotropes ralentissent un tel développement. Une première approche a consisté en la synthèse de peptides

cycliques mimant la structure de la chimiokine CXCL12 et bloquant son récepteur, CXCR4. Ce développement a été initié en vue de traitements anti-HIV, mais s'est poursuivi dans le domaine du cancer, et plusieurs molécules sont actuellement en essai thérapeutique. Une deuxième approche est la recherche, par criblage de chimiothèques, de petites molécules inhibant les récepteurs de chimiokines, en particulier CXCR4, mais aussi CXCR1, CXCR2 et CXCR7. Ces molécules ont montré un intérêt en situation préclinique et devraient prochainement faire l'objet d'essais cliniques. Le ciblage des chimiokines elles-mêmes est envisageable avec des petites molécules capables de les piéger avant leur interaction avec un récepteur. Enfin, les réussites thérapeutiques nombreuses que connaissent les anticorps monoclonaux encouragent fortement la mise au point d'anticorps thérapeutiques dirigés soit contre les chimiokines elles-mêmes, soit contre leurs récepteurs.

Bibliographie

- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. (2007) Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*; 25: 787-820.
- Berridge MJ. (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 933-40.
- Dhanasekaran, Tsim ST, Dermott JM, Onesime D. (2008) Regulation of cell proliferation by G proteins. *Oncogene* 1998; 17: 1383-94.
- Dorsam RT, Gutkind JS. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*; 7: 79-94.
- Fraser CC. (2008) G protein-coupled receptor connectivity to NF-kappaB in inflammation and cancer. *Int Rev Immunol*; 27: 320-50.
- Heasley LE. (2001) Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*; 20: 1563-9.
- Houshmand P, Zlotnik A. (2003) Therapeutic applications in the chemokine superfamily. *Curr Opin Chem Biol*; 7: 457-60.
- Karnoub AE, Weinberg RA. (2006-2007) Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis*; 26: 75-85.
- Kehrl JH. (2006) Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol Res*; 34: 211-27.
- Lagerstrom MC, Schioth HB. (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*; 7: 339-57.
- Marinissen MJ, Gutkind JS. (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*; 22: 368-76.
- Olson TS, Ley K. (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol*; 283: R7-28.
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D *et al.* (2003) Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol*; 111: 1185-99.
- Waugh DJ, Wilson C. (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*; 14: 6735-41.
- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. (2006) The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*; 7: 243.
- Zlotnik A. (2006) Chemokines and cancer. *Int J Cancer*; 119: 2026-9.

Chapitre 7

La voie Wnt

Introduction

La voie Wnt ou voie de la β -caténine est une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans la programmation cellulaire des cellules souches vers la différenciation ou la prolifération. Cette voie est complexe et l'ensemble de ses rôles physiologiques est encore loin d'être déchiffré. On trouvera dans cette voie des protéines du nom de *Wingless*, *Frizzled*, *Dishevelled*, qui désignent des mutants du développement de la drosophile, ce qui témoigne de son universalité dans le règne animal. Certaines altérations génétiques de cette voie chez l'homme déterminent des pathologies congénitales ; plusieurs altérations somatiques ou germinales sont liées à l'oncogenèse.

Brièvement, des messagers protéiques appelés WNT activent des récepteurs membranaires appelés *Frizzled* (FZD), et cette activation aboutit à la stabilisation de la forme cytoplasmique d'une protéine impliquée dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux, la β -caténine. Cette dernière peut alors être transférée dans le noyau où elle pourra activer des programmes de transcription de nombreux gènes, en particulier ceux qui codent pour des protéines nécessaires à la prolifération (cycline D1, MYC, etc.).

Les ligands WNT et leurs récepteurs

Dix-neuf protéines WNT distinctes existent chez l'homme, le nom complet des gènes étant *Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site*. Le premier d'entre eux, *WNT1*, avait été identifié au site d'intégration d'un rétrovirus induisant des tumeurs mammaires chez la souris et appelé *Int1*, montrant d'emblée un rôle potentiel dans le développement normal et dans l'oncogenèse ; il avait été ensuite assimilé au gène *Wingless* de la drosophile : son nom résulte de la contraction de *Wingless* et de *Integration*.

Les protéines WNT sont des glycoprotéines riches en cystéine sécrétées par divers types cellulaires ; leurs gènes sont organisés en plusieurs *clusters* localisés sur des chromosomes différents et possèdent une grande homologie entre eux, et avec les gènes correspondants chez tous les métazoaires. Il existe une spécificité tissulaire de l'expression de ces protéines, mais le rôle individuel de chaque protéine WNT est encore mal connu.

Les ligands WNT sont reconnus par des récepteurs FZD (Frizzled) ; il en existe dix chez l'homme, mais la combinatoire entre les dix-neuf ligands et les dix récepteurs n'est pas connue avec précision. L'activation de ces récepteurs nécessite la présence d'un corécepteur phosphorylable, LRP5 ou LRP6 (*LDL receptor related protein*).

Les récepteurs FZD sont des protéines à sept domaines transmembranaires, du type des GPCR (*G-protein coupled receptors*, chapitre 6) ; l'activation concomitante récepteur FZD-corécepteur LRP5/6 conduit à la formation d'un complexe avec une protéine cytoplasmique DVL (*Dishevelled*), protéine adaptatrice (il en existe trois chez l'homme, DVL1, 2 et 3) dont l'activation permet la rupture d'un complexe cytoplasmique où est engagé l'élément central de cette voie, la β -caténine. On a longtemps pensé que les récepteurs FZD fonctionnaient sans couplage avec une protéine G hétérotrimérique, à l'inverse des GPCR. Il semble en fait qu'il y ait intervention d'une telle protéine G entre l'activation de FZD et celle de la protéine DVL, de la même façon qu'elle intervient en aval de l'activation de tous les GPCR.

La voie de la β -caténine

La β -caténine (CTNNB) est une molécule impliquée à la fois dans l'adhésion cellulaire et dans la signalisation. Dans sa première fonction, elle est liée, dans le cytoplasme, au cytosquelette d'actine *via* une molécule d' α -caténine et, au niveau extracellulaire, aux structures jonctionnelles de l'E-cadhérine (CDH1) (fig. 7-1) (chapitre 11). Elle joue donc un rôle majeur dans les jonctions intercellulaires des tissus épithéliaux et dans le maintien de l'architecture tissulaire.

La β -caténine libre cytoplasmique, en équilibre avec la β -caténine liée au niveau des jonctions intercellulaires, est maintenue inactive, en absence de signal WNT, grâce à sa phosphorylation qui la conduit à sa destruction dans le protéasome. Cette phosphorylation est assurée au sein d'un complexe de dégradation dans lequel interviennent des protéines adaptatrices, axine et APC (*Adenomatous polyposis coli*), et deux sérine/thréonine kinases, la caséine kinase 1 (CK1 α) et la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), qui phosphorylent la β -caténine sur des sites distincts. La phosphorylation de la β -caténine lui permet d'être reconnue par une protéine β -TRCP (*Transducing repeat containing protein*) qui n'est autre que son ubiquitine ligase E3 qui la conduit donc à la destruction dans le protéasome (voir Annexe C) (fig. 7-2A).

L'activation de DVL, sans doute *via* une protéine G hétérotrimérique, et faisant suite à l'activation d'un récepteur FZD, entraîne la phosphorylation du corécepteur LRP5/6, sur un motif PPPSPXS, par une caséine kinase membranaire (CK1 γ) et par la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β), dont la fonction de phosphorylation de la β -caténine est inhibée (fig. 7-2B). C'est cette phosphorylation qui crée un signal

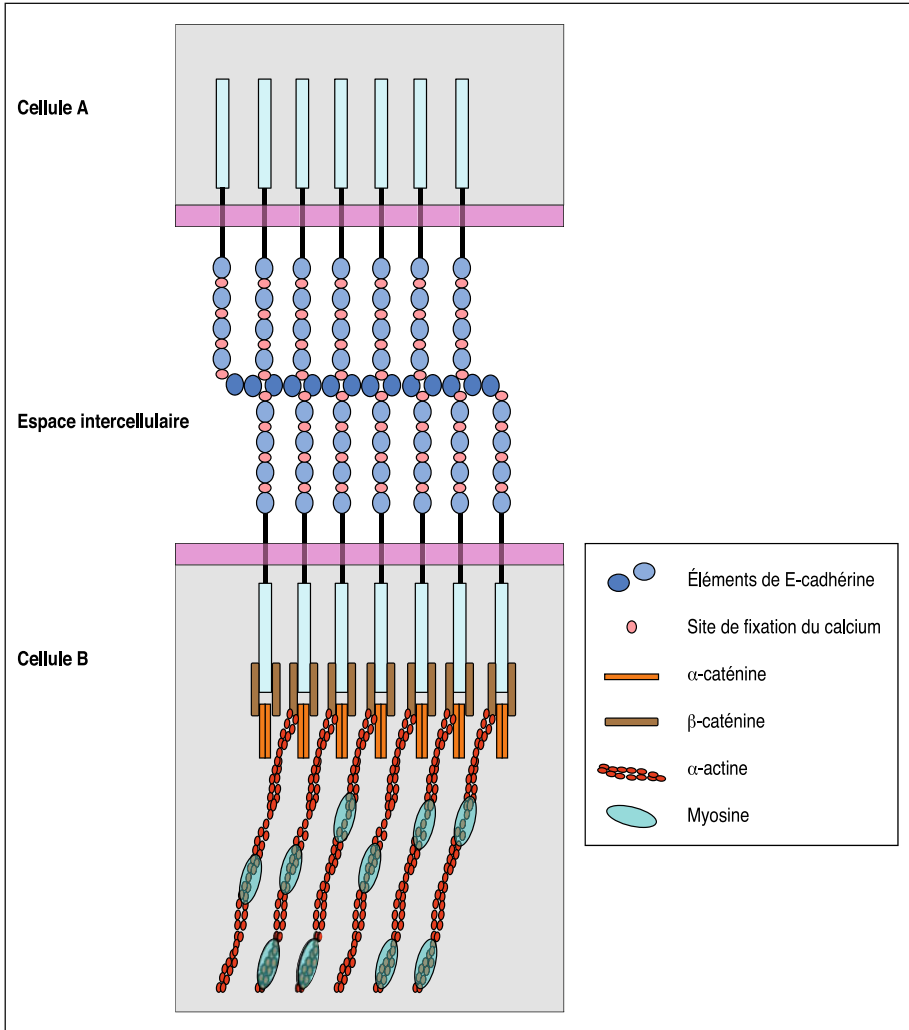


Fig. 7-1 – Les jonctions serrées à base de cadhérine E.

Ces jonctions intercellulaires mobilisent la β -caténine, qui permet l'ancrage de l'E-cadhérine au cytosquelette d'actine, *via* une molécule d' α -caténine.

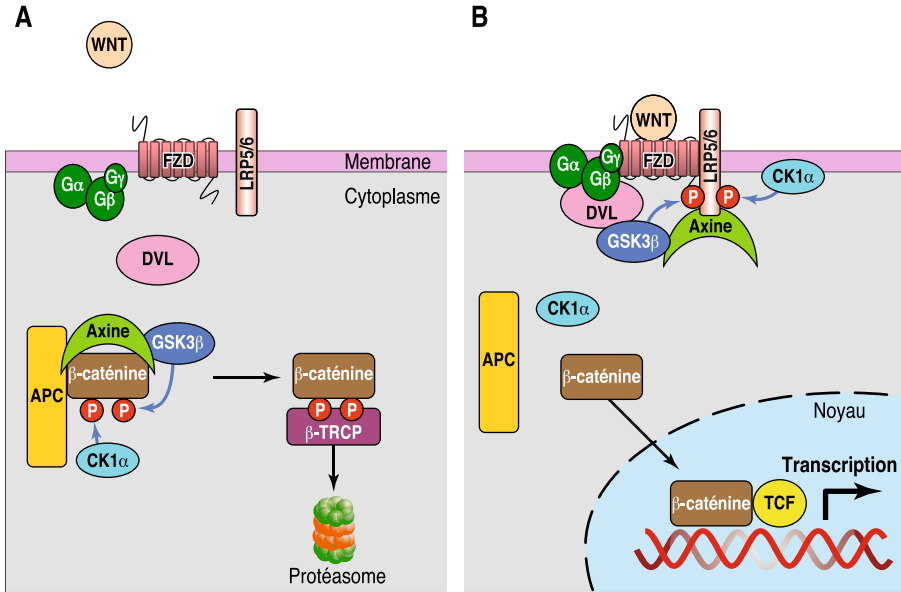


Fig. 7-2 – La voie Wnt-β-caténine.

A. En absence de stimulation des récepteurs FZD par un ligand WNT, la β-caténine est phosphorylée, dans un complexe de destruction dont font partie l'axine et la protéine APC, par les kinases GSK3β et CK1α. Cette phosphorylation la conduit vers son ubiquitine-ligase, β-TRCP, et vers le protéasome.

B. En présence d'un ligand WNT sur le récepteur FZD, la protéine DVL est recrutée, sans doute *via* l'activation d'une protéine G, ce qui permet la phosphorylation du corécepteur LRP5/6 par la CK1γ et la GSK3β, et le recrutement de l'axine à la membrane. Le complexe de destruction est dissocié et la β-caténine non phosphorylée peut entrer dans le noyau où elle s'associe à un ensemble de molécules impliquées dans la répression de la transcription, en particulier les facteurs TCF/LEF. La levée de la répression permet la transcription de nombreux gènes de prolifération, dont le gène *MYC* et celui de la cycline D1, tous deux impliqués dans la prolifération cellulaire, sont de bons exemples.

d'appel pour la relocalisation de l'axine à la membrane, libérant ainsi la β-caténine du complexe cytoplasmique qui entraînait jusque-là sa destruction, en absence d'activation du récepteur. Cette voie Wnt dite canonique semble le plus souvent activée après intervention de ligands WNT précis, comme WNT1, WNT3a ou WNT8.

La β-caténine libre, non phosphorylée, peut alors entrer dans le noyau. Elle pourra déplacer un facteur de transcription de la famille TCF-LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) de ses sites de reconnaissance sur l'ADN et déclencher ainsi la transcription de gènes jusque-là réprimés (fig. 7-2B). Parmi les gènes transcrits, on peut citer le gène *MYC* dont le rôle activateur de la transcription est bien connu (chapitre 2), et le gène de la cycline D1 (*CCND1*), impliqué dans la mise en route du cycle cellu-

laire (chapitre 17). Lorsqu'elle ressort du noyau, la β -caténine est reprise en charge par APC et, en absence d'un nouveau signal WNT, réintroduite dans un complexe de destruction.

D'autres systèmes semblent capables d'activer la voie de la β -caténine de façon indirecte, en induisant, par phosphorylation sur une tyrosine, la rupture de la liaison β -caténine – E-cadhérine et l'augmentation de la disponibilité en β -caténine cytoplasmique pour entrer dans le noyau : ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR, ERBB2 ou MET (chapitre 1).

Plus de cent protéines sont impliquées, à des degrés divers, dans la signalisation de cette voie. Outre les acteurs majeurs déjà mentionnés, on peut citer :

- les protéines FRAT (*Frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma*) qui inhibent la phosphorylation de la β -caténine par la GSK3 β ;
- les protéines SFRP (*Secreted frizzled-related proteins*) qui jouent un rôle de leurre pour les ligands WNT au niveau extracellulaire ; elles vont donc détourner les ligands de leur cible et contrôler négativement cette voie de signalisation ;
- la protéine WIF (*Wnt inhibitory factor*) est une protéine sécrétée qui se lie aux protéines WNT au niveau extracellulaire pour les inhiber ;
- les protéines DKK (*Dickkopf homolog*), également sécrétées, interagissent avec les corécepteurs LRP5/6, ce qui conduit à leur endocytose et à l'inactivation des récepteurs FZD.

Les voies Wnt « non canoniques »

Des voies de signalisation partant de la liaison de protéines WNT avec un récepteur FZD et n'agissant pas au niveau de la β -caténine ont été décrites. Ce sont plus particulièrement les protéines WNT5a et WNT11 qui activent les voies non canoniques. Dans une première voie, la liaison de WNT avec FZD active une phospholipase C, par l'intermédiaire d'une protéine G à sous-unité α_q , mais aussi avec mise en jeu de la protéine DVL. Cela permet ainsi d'une part la libération de calcium cytosolique *via* la voie classique de l'inositol triphosphate, et d'autre part l'activation d'une protéine kinase C *via* la formation de diacylglycérol (fig. 7-3A). Le rôle de ces seconds messagers sur la transcription a été décrit dans le chapitre 6.

Une autre voie non canonique utilise la protéine adaptatrice DVL et peut-être une protéine G hétérotrimérique pour activer la JUN N-terminal kinase (JNK) impliquée dans une voie du type MAP kinase (chapitre 2), montrant ainsi un exemple d'interconnexion entre voies de signalisation. Cette activation passe par des petites protéines G de la famille RHO, comme RHO-A, RHO-U, RAC ou CDC42 (fig. 7-3B). Cette voie commande des actions impliquées dans la polarité cellulaire plane (PCP, *Planar cell polarity*). Des récepteurs RTK particuliers, ROR et RYK, sont des récepteurs annexes ou des corécepteurs des protéines WNT capables d'activer ou de désactiver, par séquestration des ligands, cette voie non canonique (chapitre 1).

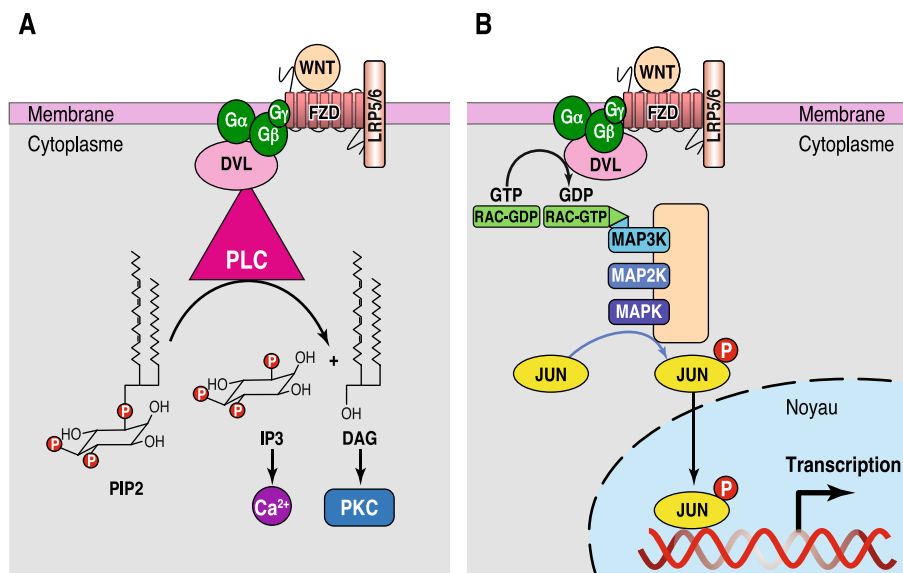


Fig. 7-3 – Les voies Wnt non canoniques.

Ces voies de signalisation sont bien activées par un message WNT mais ne mettent pas en jeu la β -caténine. En A, la protéine DVL permet l'activation d'une phospholipase C, qui génère, à partir du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate, les seconds messagers que sont le diacyl-glycérol (DAG) et le triphosphoinositol (IP3), qui activent les voies décrites au chapitre 6.

En B, la protéine DVL permet l'activation de petites protéines G comme la protéine RAC, qui permet l'activation d'une cascade de MAP kinases aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription JUN et à l'activation de gènes de prolifération (voir chapitre 2).

Altérations oncogéniques

Il existe de nombreuses altérations génétiques de cette voie de signalisation qui conduisent à des anomalies du développement de l'embryon et du fœtus et déterminent des pathologies congénitales graves qui ne seront pas décrites ici. Les altérations oncogéniques peuvent concerner des régulateurs positifs de cette voie, qui se comporteront comme des proto-oncogènes, ainsi que des régulateurs négatifs qui se comporteront comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

Dans les cancers humains, de nombreuses altérations ont été observées ; certaines sont des mutations bien identifiées, d'autres sont des modifications d'expression dont le rôle moteur dans l'oncogenèse n'est pas démontré.

Ligands WNT	}	→	Expression augmentée dans de nombreux cancers ;
Récepteurs FZD			
Régulateurs DSL			
LRP5		→	Mutations de type gain de fonction ;
APC	}	→	Mutations germinales et somatiques, de type perte de fonction ;
Axines			
β -caténine		→	Mutations germinales et somatiques, de type gain de fonction ;
SFRP, WIF		→	Expression diminuée dans de nombreux cancers.

Le gène *APC* est connu de longue date comme un gène suppresseur de tumeurs jouant un rôle majeur dans l'oncogenèse colorectale. Ses mutations germinales sont à l'origine de la polyposse colique familiale, un des deux grands syndromes de prédisposition héréditaire au cancer colorectal. Au niveau somatique, ses mutations constituent, dans le modèle de Vogelstein, l'événement initial le plus fréquent. Ce sont généralement des mutations de type non-sens et elles conduisent à une protéine tronquée. Il semblerait que la mutation d'un seul allèle soit suffisante pour constituer cet événement initial, par un phénomène d'haplo-insuffisance.

Les cancers colorectaux sont particulièrement dépendants, pour leur formation comme pour leur croissance, de la voie de la β -caténine. Outre les mutations d'*APC*, celles de l'axine 2 ou de la β -caténine elle-même sont fréquentes. Des altérations de cette voie sont également rencontrées dans les hépatocarcinomes, les cancers de l'ovaire et les tumeurs desmoïdes ou fibromateuses profondes.

Cibles pharmacologiques

La voie de la β -caténine représente donc une cible potentielle majeure en cancérologie, en particulier pour les cancers colorectaux qui conservent tout au long de leur évolution une « addiction » certaine à cette voie. Nous n'évoquerons pas ici le rôle potentiel des anti-inflammatoires non stéroïdiens et des vitamines A et D sur l'inhibition possible de cette voie, mais les développements pharmacologiques ciblés.

Une première approche consiste en la synthèse d'anticorps dirigés contre les ligands WNT ou contre les récepteurs FZD. Des résultats encourageants ont été obtenus sur des modèles cellulaires et animaux.

Au niveau des petites molécules, une approche peut être le ciblage des complexes transcriptionnels TCF- β -caténine. Plusieurs molécules ont été identifiées lors de criblages à grande échelle (*High-throughput screening*) comme capables d'interagir avec la β -caténine pour empêcher sa liaison au TCF. Plus en amont, des molécules susceptibles d'interagir avec les complexes FZD-DVL sont activement recherchées dans des programmes de criblage à grande échelle.

Enfin, il semble pouvoir exister des molécules régulant positivement l'activité de GSK3 β ; il s'agit de facteurs de différenciation de *Dictyostelium discoideum* qui pour-

raient être également actifs sur les cellules de mammifères et se comporter comme des inhibiteurs de la voie de la β -caténine.

Bibliographie

- Angers S, Moon RT. (2009) Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 10: 468-77.
- Arce I, Yokoyama NN, Waterman ML. (2006) Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene*; 25: 7492-504.
- Barker N, Clevers H. (2006) Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 997-1014.
- Fodde R, Brabletz T. (2007) Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*; 19: 150-8.
- Gavert N, Ben-Ze'ev A. (2007) Beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*; 102: 820-8.
- Huang H, He X. (2008) Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*; 20: 119-25.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*; 27: 6920-9.
- Katoh M, Katoh M. (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*; 13: 4042-5.
- Kikuchi A, Yamamoto H. (2008) Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci*; 99: 202-8.
- Kimelman D, Xu W. (2006) Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*; 25: 7482-91.
- Klaus A, Birchmeier W. (2008) Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*; 8: 387-98.
- Mikels AJ, Nusse R. (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*; 25: 7461-8.
- Polakis P. (2007) The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*; 17: 45-51.
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. (2007) The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci*; 104: 293-302.
- Wang Y. (2009) Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*; 8: 2103-9.

Chapitre 8

La voie Notch

Introduction

Comme la voie Wnt, la voie Notch est une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules souches vers leur différenciation. La perte de fonction de certains de ses composants est rencontrée dans des pathologies héréditaires et leur surexpression dans certaines pathologies cancéreuses.

Brièvement, des messagers protéiques appelés DSL (*Delta*, *Serrate*, *Lag2*, du nom des ligands rencontrés respectivement chez les mammifères, la drosophile et *Caenorhabditis elegans*) reconnaissent des récepteurs membranaires appelés NOTCH et les activent en provoquant leur clivage. Le produit de clivage peut alors migrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles en inhibant l'action de répresseurs. Un des points notables de cette voie de signalisation est qu'elle agit entre cellules juxtaposées, ligands et récepteurs étant des protéines transmembranaires : la présentation d'un ligand à une cellule par une cellule voisine induit l'activation du récepteur de la première.

Les ligands DSL

Deux types de ligands DSL sont susceptibles de reconnaître les récepteurs NOTCH chez les mammifères : les ligands DLL (*Delta-like ligands*) et les ligands JAG (pour *Jagged*, un mot anglais signifiant « dentelé ») qui correspondent aux ligands *Serrate* de la drosophile. Ces ligands sont des protéines transmembranaires de type I (c'est-à-dire ayant leur extrémité N-terminale du côté extracellulaire).

Ces ligands possèdent un domaine intracytoplasmique de petite taille, un domaine transmembranaire et des domaines extracellulaires caractéristiques : de dix à quatorze motifs EGF-like (*Epidermal growth factor*) répétés en tandem, un domaine DOS (*Delta and OSM-11-like proteins*), absent des ligands DLL3 et DLL4, et un domaine DSL. Les ligands DLL3 et DLL4, dépourvus de domaine DOS, agissent en

présence d'un coligand DLK (*Delta-like protein homolog*) possédant un domaine DOS, des motifs EGF-like, mais pas de domaine DSL. La présence simultanée d'un domaine DOS et d'un domaine DSL semble indispensable à l'interaction ligand-récepteur, que le domaine DOS soit apporté directement par le ligand (cas de JAG1, JAG2 et DLL1) ou par un coligand (cas de DLL3 et DLL4). La structure des ligands et coligands de la voie Notch est présentée figure 8-1.

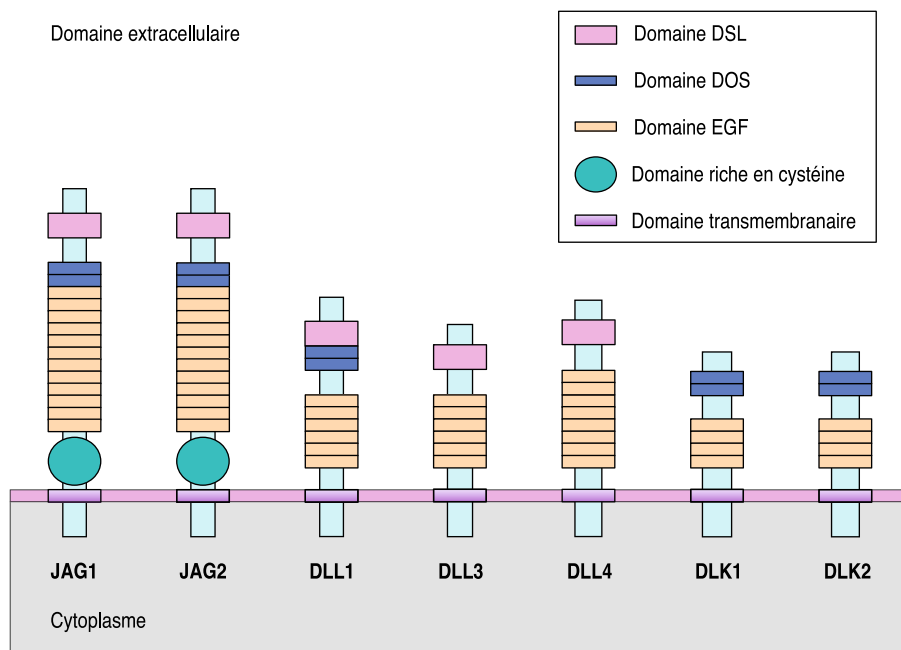


Fig. 8-1 – Les ligands DSL.

Les ligands DSL contiennent une série de domaines particuliers essentiels pour leur fonction : les domaines de reconnaissance DSL et DOS et les domaines *EGF-like* (au nombre de six à quatorze). Les ligands JAG contiennent en outre un domaine riche en cystéine. Les ligands DLL3 et DLL4 n'ont pas de domaine DOS ; ils sont dépendants de la présence de coligands DLK1 et DLK2 qui possèdent un domaine DOS, mais n'ont pas de domaine DSL.

Les récepteurs NOTCH

Les ligands DSL sont reconnus par des récepteurs NOTCH (d'un autre mot anglais signifiant « dentelé ») ; il en existe quatre chez l'homme. Ce sont également des protéines à un seul domaine transmembranaire, de type I. Alors que chez la drosophile la séquence polypeptidique est continue et couvre les parties extra- et intracellulaires, les récepteurs sont, chez les mammifères, des hétérodimères obtenus, dans l'appareil de Golgi, par clivage post-traductionnel au niveau d'un site extracellulaire proche du domaine transmembranaire, suivi d'une réassociation par des liaisons non covalentes. Les monomères constitutifs de l'hétérodimère portent le nom de NECD (*Notch extra-cellular domain*) et NTMIC (*Notch transmembrane and intracellular domain*).

Les récepteurs NOTCH possèdent, dans leur partie extracellulaire, entre vingt-neuf et trente-six motifs homologues de la structure de l'EGF répétés en tandem. Ces motifs *EGF-like* contiennent des sites d'O-glycosylation par des résidus fucose ou par des résidus glucose. Les motifs *EGF-like* sont suivis d'une séquence appelée NRR (*Negative regulatory region*) faite de trois motifs LNR (*Lin12 and Notch repeats*) et d'un domaine d'hétérodimérisation HD où se situe le site de clivage S1 mentionné ci-dessus, réalisé par une protéase appelée furine. Du côté intracellulaire, après le domaine transmembranaire, se trouve un motif RAM (*RBPJK [Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region]-association module*), des séquences de localisation nucléaire (NLS), des domaines ANK (*Ankyrin repeats*) et un domaine de transactivation qui héberge des motifs PEST (*Proline-glutamic acid-serine-threonine rich domains*). La figure 8-2 présente la structure générale des récepteurs NOTCH.

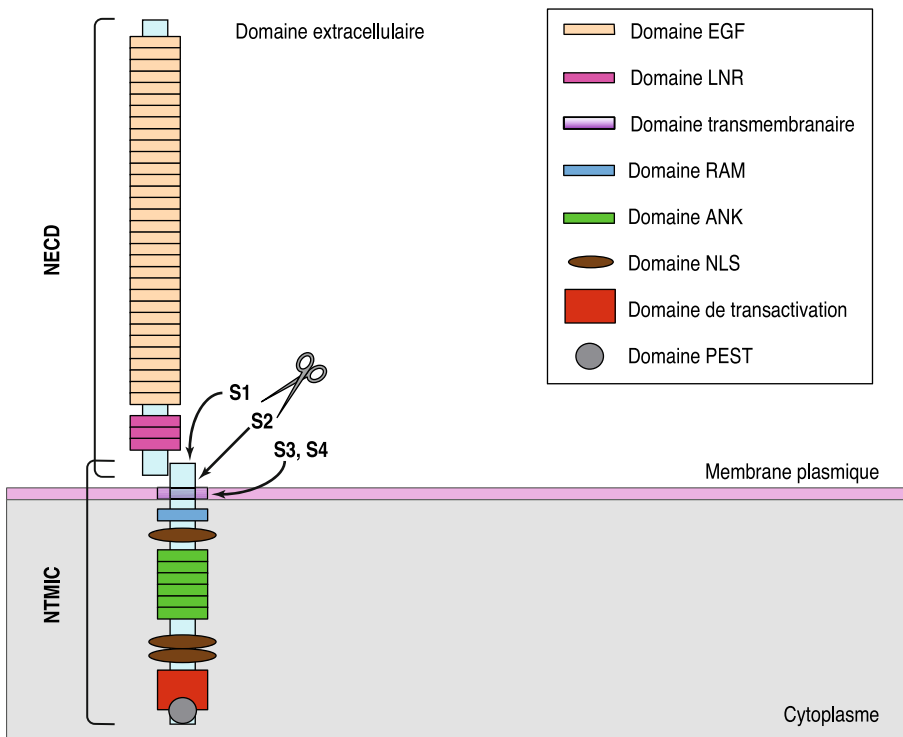


Fig. 8-2 – Les récepteurs NOTCH.

Les quatre récepteurs NOTCH sont construits sur le même modèle, associant un monomère extracellulaire (NECD) et un monomère transmembranaire et intracellulaire (NTMIC) réunis par interaction non covalente au niveau d'un domaine d'hétérodimérisation HD, les deux monomères étant issus d'une même protéine clivée au niveau de ce domaine HD dans l'appareil de Golgi. Le NECD contient de 29 à 36 domaines *EGF-like*, et trois domaines LNR jouant un rôle dans la régulation négative de l'activité Notch en protégeant le site de clivage S2 dans le domaine HD. Le NTMIC contient un domaine RAM d'interaction avec des protéines de liaison de l'ADN, des séquences de localisation nucléaire, des domaines ANK répétés pour le recrutement d'activateurs transcriptionnels MAML et un domaine de transactivation contenant des séquences PEST.

L'activation des récepteurs NOTCH

La liaison entre ligand et récepteur par interaction homotypique des domaines *EGF-like* entraîne le clivage protéolytique du récepteur par une métalloprotéinase, ADAM10 (*A disintegrin and metalloproteinase*) ou ADAM17 (également appelée TACE, *TNF-alpha converting enzyme*), au niveau d'un site S2 situé dans le domaine d'hétérodimérisation, donc du côté extracellulaire du récepteur, à douze acides aminés du domaine transmembranaire. Ce clivage est permis par un changement de conformation qui enlève la protection qu'exerçaient les domaines LNR sur le site S2. Il se forme un intermédiaire appelé NEXT (*Notch extracellular truncation*) qui est substrat d'une autre activité protéolytique catalysée par une γ -sécrétase agissant au niveau transmembranaire sur deux sites successifs appelés S3 et S4. À l'issue de ce clivage, la partie intracellulaire de NOTCH (NICD) est capable de migrer dans le noyau, grâce au démasquage de son domaine de localisation nucléaire. Les γ -sécrétases sont des complexes multimériques transmembranaires dont font partie les présénilines (PSEN) 1 et 2, la nicastrine (NCSTN) et des facteurs d'activation et de stabilisation de ces protéases.

Au niveau nucléaire, le NICD interagit, par l'intermédiaire de son domaine RAM, avec une protéine de liaison à l'ADN dont le nom générique est CSL (*CBF/Core-binding factor*1/ *Su(H)/Lag-1*) et qui est chez l'homme la protéine RBPJK. Le domaine ANK permet ensuite le recrutement du coactivateur MAML (*Mastermind-like protein*), qui à son tour recrute le facteur MED8 (*Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 8*), ce qui permet l'activation de la transcription de gènes cibles. La figure 8-3 présente les étapes de la maturation post-traductionnelle du récepteur NOTCH, son interaction avec les ligands DSL, sa protéolyse, la migration de sa partie active vers le noyau et son interaction avec les complexes transcriptionnels activateurs et répresseurs.

Le récepteur NOTCH, qui doit être clivé pour agir et dont la partie intracellulaire constitue en fait le second messager, ne peut servir qu'une fois : la disponibilité en ligand et en récepteur à la surface des deux cellules échangeant un message est donc un facteur décisif pour la transmission d'information par cette voie. Synthèse et dégradation des ligands et des récepteurs sont les éléments clés de cette régulation. Le rôle de l'ubiquitinylation pour l'endocytose et la destruction des ligands comme des récepteurs par le protéasome est capital (voir Annexe C), mais nous ne présenterons pas ici les divers effecteurs de cette dégradation.

Le domaine HD, qui contient les sites de clivage par les protéases mises en jeu successivement, est sans doute le domaine le plus « sensible » des récepteurs NOTCH. La glycosylation des motifs *EGF-like* des récepteurs NOTCH constitue également un point important pour le contrôle de cette voie de signalisation. Enfin, de nombreuses interactions entre voies de signalisation existent au niveau des gènes activés, au niveau transcriptionnel, par la voie Notch et d'autres voies ; c'est ainsi, pour se limiter à un seul exemple de *crosstalk*, que le ligand JAG1 est le produit d'un gène activé par la β -caténine (voir chapitre 7).

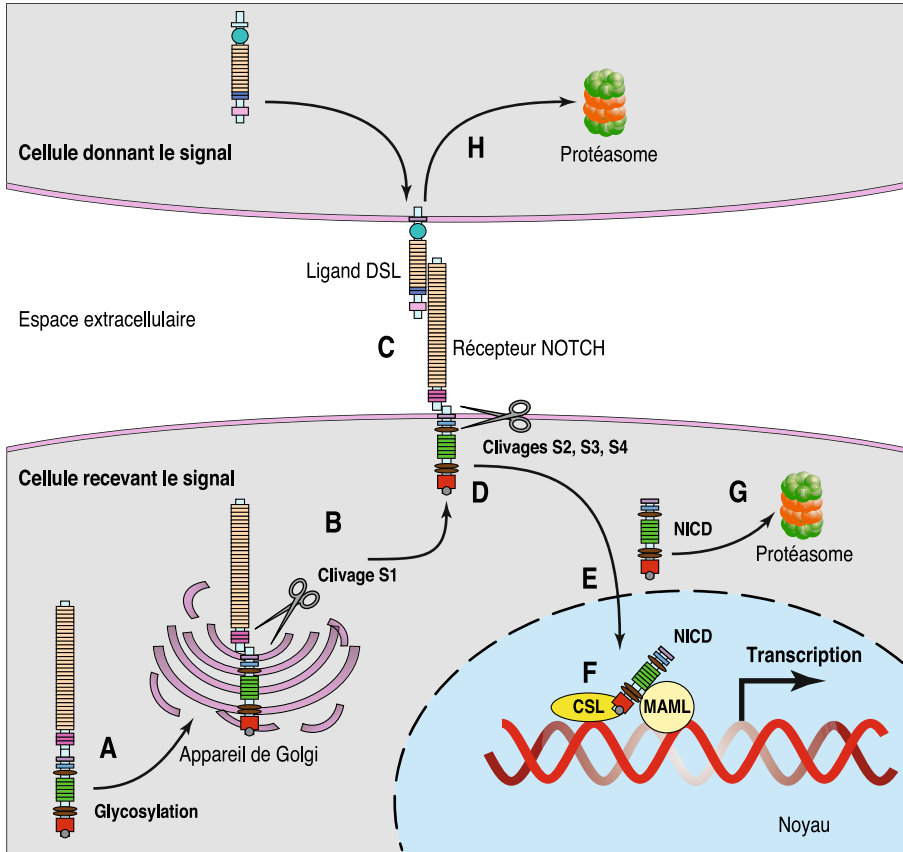


Fig. 8-3 – La voie de signalisation Notch.

À l'issue de sa synthèse, le récepteur NOTCH est fucosylé et glucosylé sur des résidus sérine et thréonine des domaines *EGF-like*, dans le réticulum endoplasmique (A). Il est ensuite clivé au niveau du site S1 du domaine HD par une protéase appelée furine (B), mais les deux produits de ce clivage, NCED et NTMIC, restent associés par des liaisons non covalentes au niveau du domaine HD pour former un hétérodimère. Au niveau membranaire, le récepteur NOTCH peut être reconnu par des ligands DSL d'une autre cellule par une interaction homotypique des domaines *EGF-like* (C). Cette reconnaissance entraîne le démasquage d'un site de clivage S2 du domaine HD du NTMIC par une protéase ADAM, qui permet ensuite un nouveau clivage, au niveau des sites transmembranaires S3 et S4, par le complexe protéolytique γ-sécrétase (D). Le récepteur ainsi tronqué (NICD) peut migrer vers le noyau grâce à ses domaines de localisation nucléaire (E). Il est reconnu, au niveau de son domaine RAM, par une protéine CSL capable de se fixer sur l'ADN, ce qui permet le recrutement d'une protéine MAML au niveau des domaines ANK (F) et la transcription des gènes cibles peut avoir lieu. Le NCID est ensuite détruit par ubiquitinylation (G) grâce à la présence des domaines PEST à son extrémité C-terminale. De même, les ligands DSL sont détruits par ubiquitinylation (H).

Altérations oncogéniques

Des altérations de type « gain de fonction » ont été identifiées originalement dans les lymphomes et les leucémies lymphoblastiques T. Elles ont été observées ultérieurement dans d'autres pathologies néoplasiques, en particulier les cancers du côlon. Le rôle de la voie Notch dans l'orientation (le « destin ») des cellules souches est certainement un élément important dans l'intérêt que lui portent les oncologues.

C'est une rare translocation t(7;9) des leucémies lymphoblastiques T qui permet, dès 1991, de montrer le rôle oncogénique d'une protéine NOTCH1 tronquée et constitutivement active. Ultérieurement, des mutations activatrices nombreuses ont été identifiées dans ces leucémies, en particulier au niveau du domaine d'hétérodimérisation HD et au niveau des domaines PEST. Les mutations du domaine HD ont pour conséquence la fragilisation de l'interaction entre NECD et NTMIC : cela facilite le clivage ultérieur aux sites S2 et S3-S4 pour le relargage spontané (en absence de contact avec un ligand DSL) du NICD. Les mutations et les délétions de la région C-terminale, en revanche, enlèvent les sites de reconnaissance du NICD par l'ubiquitine ligase et ont pour conséquence une stabilisation de la forme active du récepteur au niveau de son site d'action nucléaire.

La voie Notch joue également un rôle majeur dans la reproduction des cellules souches des villosités intestinales comme des cellules souches des cancers du sein et son inhibition permet l'orientation de ces cellules vers la différenciation. Le développement des connaissances apporte de plus en plus d'arguments pour faire de la voie Notch une voie essentielle du développement de nombreux organes et son rôle dans l'oncogenèse est encore loin d'être totalement connu.

Cibles pharmacologiques

Toute interaction pharmacologique avec les étapes successives de l'activation des récepteurs NOTCH est susceptible d'inhiber cette voie de signalisation et d'inhiber son rôle dans la reproduction des cellules souches et l'oncogenèse. On peut envisager comme cibles potentielles l'interaction entre récepteur et ligand, la glycosylation du récepteur, le clivage initial entre NCED et NTMIC, les clivages ultérieurs par ADAM et par la γ -sécrétase, l'ubiquitinylation du récepteur et celle du ligand, l'interaction du NICD avec les protéines nucléaires CSL, etc.

Jusqu'à maintenant, la cible essentielle retenue pour un développement pharmacologique est l'activité de clivage transmembranaire catalysée par le complexe de la γ -sécrétase. En effet, des inhibiteurs de γ -sécrétase avaient déjà été conçus et développés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, du fait que les activités protéolytiques générant les peptides β -amyloïdes sont également catalysées par ce complexe enzymatique. À l'heure actuelle, quelques essais cliniques d'inhibiteurs de γ -sécrétase ont été entrepris. Une autre cible, encore au stade préclinique, concerne le développement d'anticorps dirigés contre le domaine NRR du récepteur NOTCH et contre le ligand DLL impliqué plus particulièrement dans l'angiogenèse.

Bibliographie

- Brou C. (2009) Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp Cell Res*; 315: 1549-55.
- Fortini ME. (2009) Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Dev Cell*; 16: 633-47.
- Koch U, Radtke F. (2007) Notch and cancer: a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci*; 64: 2746-62.
- Kopan R, Ilagan MX. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*; 137: 216-33.
- Nefedova Y, Gabrilovich D. (2008) Mechanisms and clinical prospects of Notch inhibitors in the therapy of hematological malignancies. *Drug Resist Updat*; 11: 210-8.
- Qiao L, Wong BC. (2009) Role of Notch signaling in colorectal cancer. *Carcinogenesis*; 30: 1979-86.
- Rizzo P, Osipo C, Foreman K *et al.* (2008) Rational targeting of Notch signaling in cancer. *Oncogene*; 27: 5124-31.
- Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. (2009) A Notch updated. *J Cell Biol*; 184: 621-9.
- Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. (2009) Emerging role of Notch in stem cells and cancer. *Cancer Lett*; 279: 8-12.
- Yan M, Plowman GD. (2007) Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*; 13: 7243-6.

Chapitre 9

La voie Hedgehog

Introduction

Il s'agit d'une voie de signalisation importante dans le développement des vertébrés et des invertébrés. Elle est impliquée dans l'embryogenèse et la morphogenèse et joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules souches vers leur renouvellement et leur différenciation. La perte de fonction de certains de ses composants est rencontrée dans des pathologies héréditaires et leur surexpression dans certaines pathologies cancéreuses.

Les signaux protéiques sont émis à proximité ou à distance des cellules cibles dotées de récepteurs. Les ligands, d'abord identifiés chez la drosophile et dénommés *Hedgehog* (« hérisson » en anglais, en référence à la forme de la larve de drosophile portant une mutation invalidante du gène), ont été ensuite retrouvés chez les mammifères. Le récepteur membranaire des cellules cibles se nomme *Patched* (PTCH1). L'activation du récepteur par le ligand entraîne la levée de l'inhibition qu'exerce ce récepteur sur une protéine membranaire nommée *Smoothed* (SMO). Il s'ensuit une cascade d'événements aboutissant à l'activation de facteurs de transcription nommés GLI (pour *Glial cells*) et par conséquent à la transcription de gènes cibles.

Les ligands Hedgehog (HH)

Trois protéines Hedgehog (HH) existent chez les mammifères : elles se nomment *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) et *Desert Hedgehog* (DHH). Elles sont d'abord synthétisées sous forme d'un précurseur de 45 kDa qui subit un clivage autocatalytique libérant un peptide N-terminal de 19 kDa impliqué dans la signalisation et un peptide C-terminal de 26 kDa qui assure la fonction de clivage et une fonction de cholestérol transférase.

Les protéines HH subissent en effet des modifications post-transcriptionnelles essentielles pour leur activité ; du côté C-terminal, elles sont liées par covalence à une molécule de cholestérol ; du côté N-terminal, une palmitoyltransférase spécifique,

HHAT (*Hedgehog acyltransferase*) ou SKI (*Skinny Hedgehog*), leur attache un acide palmitique au niveau d'un résidu cystéine. Munies de ces deux prolongements hydrophobes, elles peuvent s'insérer dans la couche phospholipidique périphérique d'une lipoprotéine et former ainsi un complexe multimérique (fig. 9-1).

Le mécanisme de sécrétion des ligands HH n'est pas connu avec précision. On sait qu'il fait intervenir une protéine à douze domaines transmembranaires appelée *Dispatched* (DISP) qui est indispensable et semble jouer un rôle de transporteur transmembranaire des protéines HH. Cette protéine est caractérisée par la présence d'un domaine de reconnaissance des stérols qui doit intervenir dans le processus de reconnaissance et de sécrétion des protéines HH.

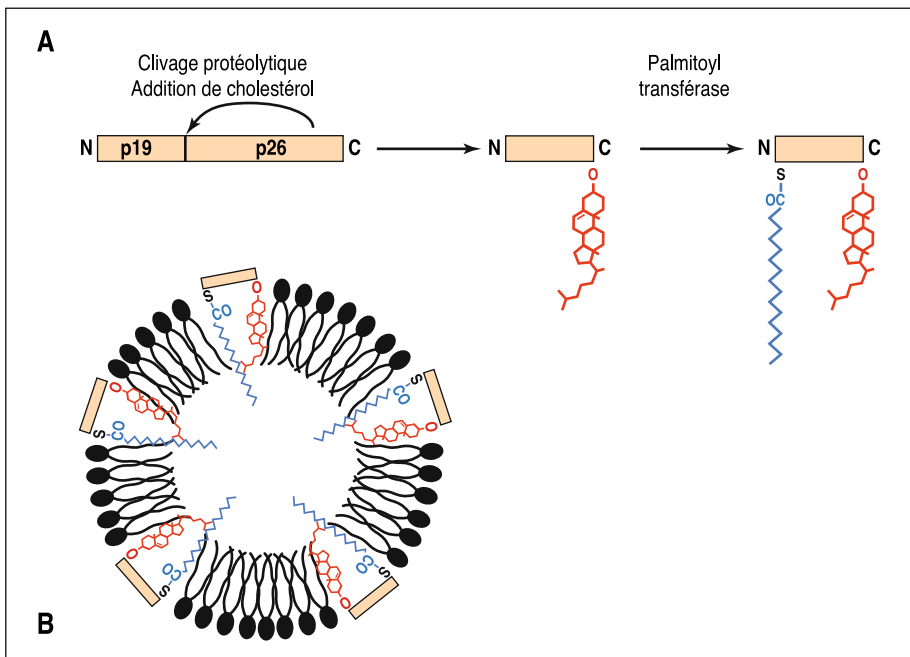


Fig. 9-1 – Les ligands HH et leurs modifications post-traductionnelles.

A. Les protéines HH natives (45 000 Da) sont clivées de façon autocatalytique pour générer un fragment de signalisation (19 000 Da) couplé de façon covalente à une molécule de cholestérol en C-terminal. Une palmitoyltransférase HHAT ajoute ensuite un acide palmitique à une cystéine située du côté N-terminal.

B. La protéine doublement substituée par un groupement lipidique est susceptible de s'insérer dans des micelles de nature phospholipidique constitutives de lipoprotéines.

Les récepteurs *Patched* et leur activation

Les ligands HH avec leurs deux substituants lipidiques sont reconnus sur une cellule cible par des récepteurs appelés *Patched* (PTCH). Il existe en fait deux protéines *Patched*, PTCH1 et PTCH2 qui semblent avoir une fonctionnalité distincte, PTCH1 étant la mieux connue et la seule étudiée ici. La protéine PTCH appartient à la même famille que la protéine DISP et possède également douze domaines transmembranaires et un domaine de liaison au cholestérol. Elle possède deux domaines extracellulaires de grande taille qui assurent la liaison avec les protéines HH. La protéine PTCH n'est qu'un intermédiaire dans la réception du signal apporté par les protéines HH, car elle transmet en fait l'information reçue à une autre protéine membranaire nommée *Smoothed* (SMO) en levant l'inhibition qu'elle exerce normalement sur cette dernière. Le mécanisme de cette inhibition et de la levée de cette inhibition lors de la réception du signal HH n'est pas connu avec précision, mais il ne semble pas exister d'interaction directe entre les protéines PTCH et SMO. La protéine PTCH serait une protéine de transport et contrôlerait la localisation d'une petite molécule activatrice ou inhibitrice de SMO qui reste à identifier. En absence de signal, PTCH pomperait cette molécule de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule ; sa liaison avec HH arrêterait ce pompage et SMO pourrait alors fonctionner (fig. 9-2). Certains auteurs pensent que la petite molécule transportée par PTCH et agissant sur SMO pourrait être un oxystérol ou la vitamine D3.

La protéine SMO est une protéine membranaire à sept domaines transmembranaires, apparentée aux GPCR (*G protein-coupled receptors*) étudiés dans le chapitre 6. Lors de la liaison d'un ligand HH avec la protéine PTCH, la protéine SMO s'accumule dans les cils primaires, qui sont des organelles, présentes dans la plupart des cellules des vertébrés, formant des protrusions à la surface cellulaire, dépourvues de motilité et basées sur un squelette de microtubules. La migration de SMO vers les cils primaires est indispensable à la signalisation par la voie Hedgehog. Cette migration s'accompagne d'une phosphorylation de SMO par une kinase GRK2 (*GPCR kinase 2*) qui pourrait être un prérequis pour la migration. Des protéines autres que PTCH sont capables de reconnaître les ligands HH et de moduler le signal qu'ils apportent à la cellule cible : CDO (*Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes*) et BOC (*Brother of CDO*), qui fonctionnent comme des récepteurs accessoires de HH dont on ne sait pas s'ils sont indispensables à la transmission du signal. Ils agissent *via* un site de liaison avec des glycosaminoglycanes (héparane sulfate). Une autre protéine, HHIP (*Hedgehog interacting protein*), serait un récepteur leurre pour les ligands HH et inhiberait la voie de signalisation.

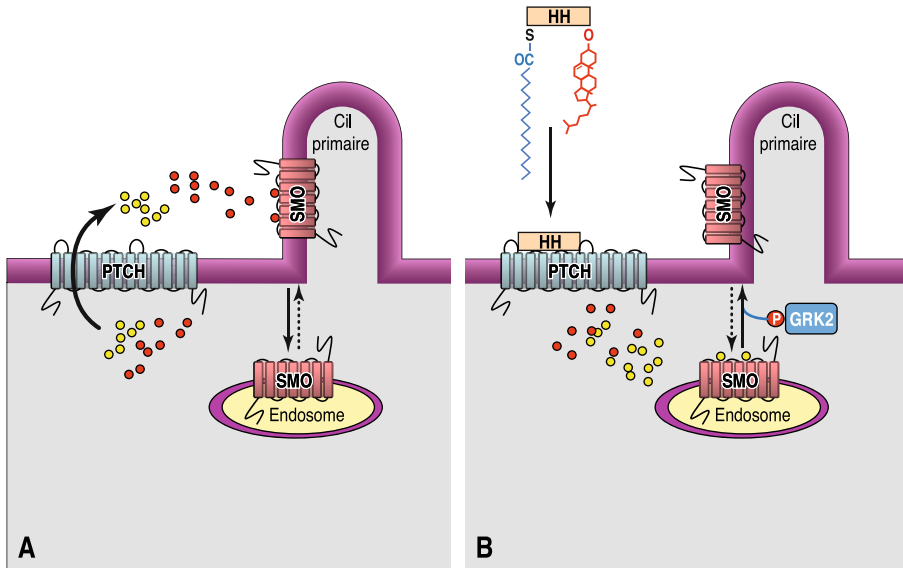


Fig. 9-2 – Les récepteurs PTCH et la transmission de l'information aux protéines SMO.

Cette figure présente un modèle possible de l'activation de SMO par les ligands HH *via* le récepteur PTCH. La protéine membranaire SMO est inactive dans sa localisation endosomale et active une fois qu'elle a migré vers le cil primaire. Dans une première hypothèse, les oxystérols favoriseraient la migration de SMO vers les cils primaires et stabiliseraient la forme active de SMO. En absence de ligand HH (schéma A), le récepteur PTCH pomperait les oxystérols vers l'extérieur de la cellule et empêcherait ainsi leur action positive sur la localisation ciliaire de SMO. En présence du ligand HH (schéma B), la fonction de pompage serait inhibée et les oxystérols seraient disponibles pour maintenir SMO sous sa forme active. Dans une autre hypothèse, le substrat de l'activité de transporteur de PTCH serait un stérol inhibiteur de SMO (la vitamine D3 ?) et favoriserait la forme inactive, endosomale de SMO. En absence de ligand HH (A), le récepteur PTCH pomperait ces stérols inhibiteurs vers l'extérieur de la cellule où ils inhiberaient la forme ciliaire de SMO. En présence du ligand HH (B), la fonction de pompage serait inhibée et SMO ne serait plus déstabilisé par la présence de stérols inhibiteurs. Les deux hypothèses sont représentées sur les mêmes schémas A et B, les oxystérols (activateurs de SMO étant représentés par les points jaunes) et les stérols inhibiteurs de SMO par des points rouges.

La transmission du signal apporté par les protéines HH

Alors que les étapes antérieures de la voie Hedgehog sont globalement similaires entre drosophile et mammifères, il n'en est pas de même pour ce qui est de la transduction du signal à partir de l'activation de SMO, et les protéines impliquées chez la drosophile n'ont pas été retrouvées chez l'homme. En absence de signal HH, des facteurs de transcription appelés GLI (*Glioblastoma associated oncogene*) et au nombre de trois sont phosphorylés au niveau du cil primaire par diverses kinases : PKA (*Protein kinase A*), CK1 (*Casein kinase 1*) et GSK3 β (*Glycogen synthase kinase 3 β*) et ces phosphorylations les conduisent vers le protéasome. Une fraction non détruite de GLI3, et à un moindre degré de GLI2, joue même un rôle de répresseur transcriptionnel par

un phénomène de dominance négative. En présence d'un signal HH, les kinases sont inhibées et les facteurs de transcription GLI peuvent migrer vers le noyau pour activer leurs gènes cibles (fig. 9-3). L'inhibition de la PKA pourrait être due à la mise en jeu par SMO d'une protéine G à sous-unité α_i , qui inhibe l'adénylyl cyclase, donc la production de cAMP, donc l'activation de la PKA (chapitre 6). Chez la drosophile, une protéine d'assemblage, Cos2, est responsable de l'activation concertée des

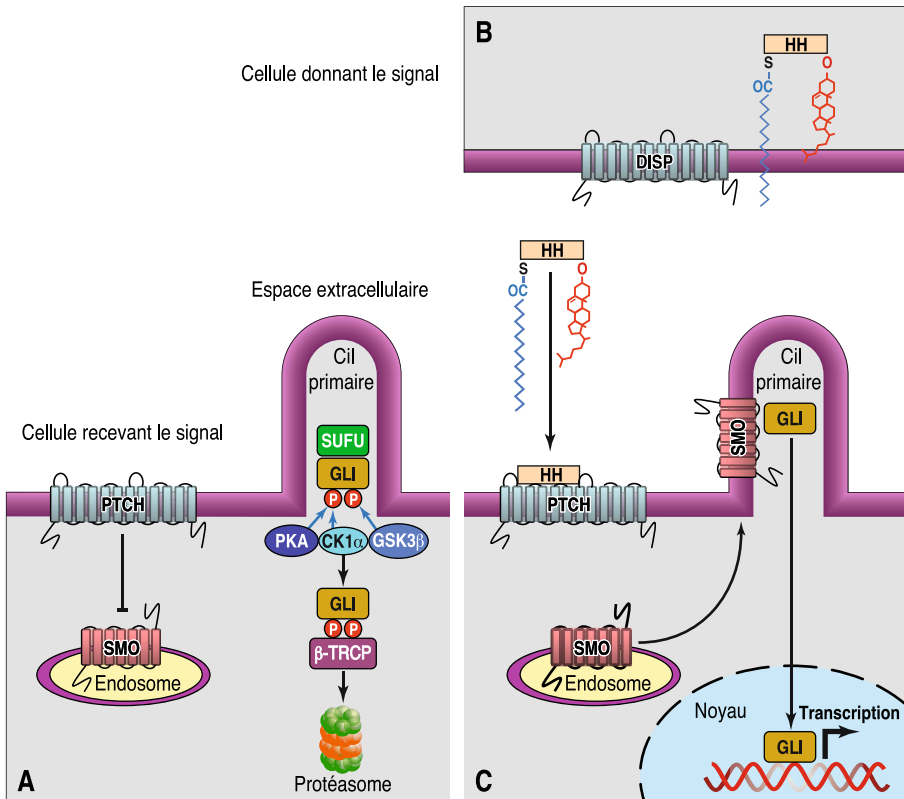


Fig. 9-3 – La voie de signalisation Hedgehog.

A. En absence de ligand HH, le récepteur PTCH inhibe la protéine SMO et l'empêche de migrer vers les cils primaires. Les facteurs de transcription GLI sont phosphorylés au niveau des cils primaires par plusieurs kinases (CK1, PKA, GSK3 β), et cette phosphorylation les conduit vers le protéasome.

B. Les ligands HH sont maturés après la traduction et quittent la cellule qui les synthétise *via* la protéine membranaire DISP.

C. En présence de ligand HH sur le récepteur PTCH, SMO peut migrer vers les cils primaires et cela empêche la phosphorylation des facteurs de transcription GLI. Ces derniers peuvent migrer vers le noyau et activer des programmes de transcription. Un des principaux régulateurs négatifs de cette voie est la protéine SUFU. Un régulateur positif (non représenté ici) pourrait être une protéine G hétérotrimérique à sous-unité α_i , mise en jeu par SMO, inhibant la production de cAMP et par conséquent la PKA.

kinases ; son recrutement par SMO empêche l'action de ces dernières. Chez les mammifères, il n'existe pas de protéine orthologue de Cos2 et cette fonction pourrait être assurée par la kinésine KIF7 ; c'est en fait une protéine appelée SUFU (*Suppressor of fused*) qui est le principal régulateur négatif des facteurs GLI chez les mammifères, alors qu'elle ne joue qu'un rôle annexe chez la drosophile.

Les gènes cibles des facteurs de transcription GLI sont des gènes impliqués dans la morphogenèse, en particulier des gènes *HOX* (*Homeobox*). Les gènes *PTCH1* et *HHIP* sont eux-mêmes des gènes cibles, ce qui se traduit par des régulations positives et négatives de cette voie de signalisation. Des gènes codant pour des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, comme *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*), la cycline D1 ou le *PDGFR α* (*Platelet-derived growth factor receptor α*), sont également des gènes cibles de la voie Hedgehog.

Altérations oncogéniques

La voie Hedgehog a été d'abord mise en cause dans un syndrome de prédisposition aux carcinomes basocellulaires (CBC) de la peau, le syndrome de Gorlin. Une mutation du gène *PTCH1* a été identifiée à l'état hétérozygote dans les cellules de ces patients et une perte additionnelle de l'allèle non muté est observée dans les cellules tumorales. Ces mutations invalidantes font perdre à *PTCH1* sa propriété fondamentale d'inhibition de SMO, qui est elle-même à l'origine de l'activation de la transcription des gènes cibles des facteurs GLI. De même, les CBC sporadiques présentent également des mutations inactivatrices de *PTCH1* ou des mutations activatrices de SMO. Les gènes *PTCH1* et SMO apparaissent donc, respectivement, comme un gène suppresseur de tumeurs et comme un proto-oncogène. Les médulloblastomes et les rhabdomyosarcomes présentent également de telles mutations, ainsi parfois que des mutations inactivatrices de *SUFU*.

Dans d'autres cancers, c'est au niveau des ligands HH qu'existe une altération oncogénique. Une surexpression des messagers HH, avec pour corollaire une augmentation de l'expression des facteurs de transcription GLI, se rencontre dans des tumeurs diverses (carcinomes pancréatiques, cancers du poumon à petites cellules) sans que son rôle moteur dans l'oncogenèse ait pu être établi, mais suggérant l'existence de boucles autocrines favorisant la prolifération cellulaire. Des interactions avec la voie Hedgehog des cellules stromales ont également pu être mises en évidence. La voie Hedgehog se présente donc comme une des voies importantes mises en jeu dans l'oncogenèse, et plusieurs arguments laissent penser qu'elle est un élément important de la survie des cellules souches des cancers.

Cibles pharmacologiques

Il a été montré très tôt qu'il existait un inhibiteur naturel de la voie Hedgehog, la cyclopamine : cet alcaloïde de structure apparentée aux stéroïdes produit des anomalies du développement fœtal lorsqu'il est consommé par des brebis gestantes. Il s'agit d'un

inhibiteur de SMO qui interagit vraisemblablement avec son domaine de liaison aux oxystérols. La cyclopamine elle-même ne semble pas utilisable en thérapeutique en raison d'une très faible biodisponibilité, mais d'autres composés inhibiteurs de SMO comme le GDC-0445 sont en développement, avec des effets antitumoraux maintenant prouvés dans le CBC métastatique et le méduloblastome. Des mutations induisant une activation constitutive de la voie de signalisation ont été identifiées chez les patients répondeurs du GDC-D445, de même, *a contrario*, que des mutations secondaires au traitement, entraînant une résistance à ce composé. La vitamine D3 pourrait également se comporter comme un inhibiteur de SMO, ce qui serait en accord avec son rôle sur la trophicité cutanée.

Une autre cible potentielle est constituée par les protéines GLI, en aval de la voie Hedgehog, et plusieurs petites molécules font l'objet d'études pré-cliniques. Enfin, en amont, des anticorps monoclonaux ciblant les protéines HH ont montré un intérêt sur des modèles *in vitro* et font l'objet d'études chez l'animal.

Bibliographie

- Eaton S. (2009) Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9: 437-45.
- Epstein EH. (2008) Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*; 8: 743-54.
- Jiang J, Hui C. (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*; 15: 801-12.
- Kasper M, Jaks V, Fiaschi M, Toftgård R. (2009) Hedgehog signalling in breast cancer. *Carcinogenesis*; 30: 903-11.
- Lum L, Beachy PA. (2004) The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*; 304: 1755-9.
- Ma G, Xiao Y, He L. (2008) Recent progress in the study of Hedgehog signalling. *J Genet Genomics*; 35: 129-37.
- Rohatgi R, Scott MP. (2007) Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol*; 9: 1005-9.
- Rubin LL, de Sauvage FJ. (2006) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 1026-33.
- Scales SJ, de Sauvage FJ. (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*; 30: 303-12.
- Tang JY, So PL, Epstein EH. (2007) Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol*; 224: 257-64.
- Van den Brink GR. (2007) Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*; 87: 1343-75.
- Varjosalo M, Taipale J. (2007) Hedgehog signaling. *J Cell Sci*; 120: 3-6.

Chapitre 10

La voie des sémaphorines

Introduction

Les sémaphorines constituent un groupe de protéines de signalisation initialement décrites dans le système nerveux central où elles participent à la croissance du cône axonal et au guidage des axones. Elles ont en fait des rôles pléiotropes dans de multiples organes et peuvent stimuler ou inhiber la même fonction selon des récepteurs qu'elles activent. Les récepteurs des sémaphorines sont en particulier rencontrés à la surface des cellules endothéliales, ce qui implique un rôle dans l'angiogenèse. Les sémaphorines jouent un rôle essentiel pour la motilité et la migration cellulaires et les altérations de cette voie de signalisation contribuent à diverses pathologies comme les maladies neurodégénératives et les cancers.

Seules quelques voies de signalisation impliquant les sémaphorines sont connues à partir de la liaison du ligand jusqu'à la mise en jeu des effets intracellulaires ; ce sont celles-là que nous présenterons dans ce chapitre. Il reste très certainement beaucoup à découvrir dans ce domaine.

Les sémaphorines et leurs récepteurs

Les sémaphorines de vertébrés, au nombre de vingt, se rangent dans des classes allant de la classe 3 à la classe 7. Celles de la classe 3 sont sécrétées alors que celles des autres classes sont liées aux membranes soit par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire, soit par ancrage avec une molécule de glycosylphosphatidylinositol membranaire. Elles peuvent se comporter dans ce cas comme des récepteurs autant que des ligands. Toutes les sémaphorines possèdent un domaine N-terminal caractéristique, le domaine SEMA, et d'autres domaines spécifiques (fig. 10-1). Les sémaphorines sont actives sous forme de dimères aux constituants liés par un pont disulfure.

Il existe plusieurs types de récepteurs des sémaphorines ; les sémaphorines transmembranaires (classes 4 à 7) et la sémaphorine 3E ont pour récepteurs directs des plexines (PLXN) : plexines A pour les sémaphorines 6, plexine D1 pour la sémapho-

rine 4A, plexine B1 pour la sémaphorine 4D, plexine B3 pour la sémaphorine 5A. Les récepteurs des sémaphorines sécrétées (classe 3), à l'exception de la sémaphorine 3E, sont les neuropilines (NRP), mais certaines utilisent comme corécepteurs les plexines A ou D1 qui sont responsables de la transmission du signal. La sémaphorine 4A peut également utiliser un récepteur appelé TIM2 (*TRAP-interacting motif 2*) et la sémaphorine 4D un récepteur appelé CD72. Diverses molécules sont utilisées comme corécepteurs du signal apporté par ces sémaphorines : des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (chapitre 1), des intégrines (chapitre 11) et des protéines diverses : TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) et DAP12 (*DNAX-activation protein 12*), protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) ou à chondroïtine sulfate (CSPG).

Les plexines, qui apparaissent comme les principaux récepteurs (parfois corécepteurs) des sémaphorines, comportent quatre classes (de A à D) et sont au nombre de neuf chez les vertébrés. Ce sont des protéines à un seul domaine transmembranaire possédant, du côté cytoplasmique, un domaine GAP d'activation de l'activité GTPase de petites protéines G. Elles contiennent un domaine de liaison à des protéines comme RHO-D, RND1 et RAC1. Les plexines B possèdent en outre, du côté C-terminal, un domaine PDZ (*PSD95/DLG/ZO1*) de liaison avec un facteur d'échange GDP-GTP (GEF) pour de telles petites protéines G. La partie extracellulaire des plexines contient un domaine SEMA et les plexines de classe B possèdent en outre un domaine protéolytique analogue à celui des convertases comme la furine (fig. 10-1).

Les neuropilines, au nombre de deux, sont les récepteurs des sémaphorines 3 à l'exception de la SEMA3E. Elles contiennent deux domaines de liaison au complément (CUB), deux domaines homologues au facteur de coagulation V/VIII et un domaine appelé MAM important pour leur dimérisation et leur interaction avec d'autres récepteurs. Leur domaine intracellulaire est très court et ne semble pas pouvoir transduire de signal, ce qui explique la nécessité d'une plexine comme corécepteur. Les neuropilines peuvent également servir de récepteur de certaines formes de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (chapitre 1) et interagissent avec les récepteurs du VEGF. Elles interagissent aussi avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comme MET (*Mesenchymal-epithelial transition factor receptor tyrosine kinase*), FGFR2 (*Fibroblast growth factor receptor 2*), PDGFRB (*Platelet-growth factor receptor 2*) et servent ainsi de corécepteurs à plusieurs facteurs de croissance (chapitre 1). Enfin, elles interagissent également avec des facteurs d'adhésion de la famille des CAM (*Cell adhesion molecules*) et des intégrines (chapitre 11).

La transmission du signal apporté par les sémaphorines

La variété des sémaphorines et de leurs récepteurs explique pourquoi les voies de signalisation qu'elles activent ne sont que partiellement connues. Seules les voies commandées par les sémaphorines 3A et 4D ont été décortiquées et seront présentées ici. De façon générale, il semble que les différents complexes sémaphorine-plexine activent chacun un ou plusieurs systèmes de transduction et que les complexes de réception n'activent pas un système de transduction propre, mais des molécules

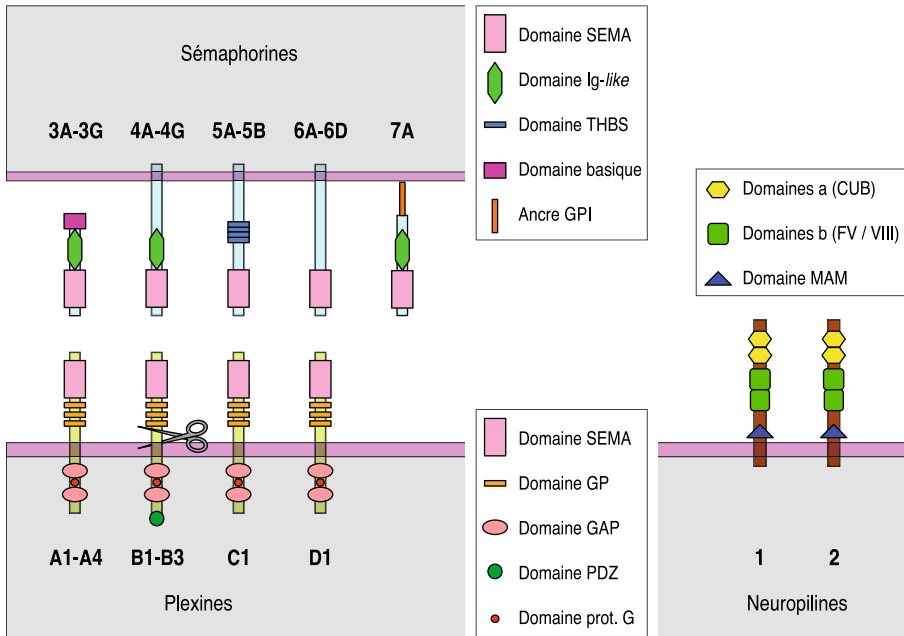


Fig. 10-1 – Structure générale des sémaphorines, des plexines et des neuropilines.

Les sémaphorines forment un groupe de vingt et une protéines réparties en cinq classes, numérotées de 3 à 7 (SEMA3 à SEMA7). Elles sont soit sécrétées (sémaphorines 3), soit liées à la membrane de la cellule source. Cette liaison se fait par un domaine transmembranaire (sémaphorines 4 à 6) ou par un ancrage à l'aide d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI) (sémaphorine 7). Les sémaphorines contiennent toutes un domaine SEMA permettant l'interaction avec leur récepteur et, selon leur classe, un domaine *immunoglobulin-like* (IgG), un domaine *thrombospondin-like* (THBS) et un domaine basique.

Les plexines forment un groupe de neuf protéines réparties en quatre classes, de A à D (PLXNA à PLXND). Ce sont des protéines transmembranaires dotées, du côté extracellulaire, d'un domaine SEMA et de domaines riches en glycine et en proline (GP) et, du côté intracellulaire, d'un domaine GAP (*GTPase activating protein*), d'un domaine de liaison aux petites protéines G et, pour les plexines B, d'un domaine PDZ (*Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1*) de liaison avec une protéine GEF (*Guanosine nucleotide exchange factor*).

Les neuropilines sont au nombre de deux, NRP1 et NRP2. Ce sont des protéines transmembranaires formées d'un domaine intracellulaire court et d'un domaine extracellulaire porteur de deux domaines a de liaison au complément, CUB (*Complement protein, Urchin embryonic growth factor and Bone morphogenic protein 1*), de deux domaines b homologues au facteur V/VIII de la coagulation et d'un domaine c ou MAM (*Meprin, A5 protein, μ protein tyrosine phosphatase*) impliqué dans les interactions des neuropilines entre elles (dimérisation) et avec d'autres récepteurs.

impliquées dans de multiples autres voies (petites protéines G, tyrosine kinases cytoplasmiques). L'action des sémaphorines sur le cytosquelette, l'adhésion et la motilité cellulaire sont pléiotropes et certainement redondantes.

Le complexe de réception NRP1-PLXNA1, à l'état inactif, est associé à une protéine FARP2 (*FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein 2*) possédant une acti-

tivité GEF (*Guanine nucleotide exchange factor*) (fig. 10-2A). Lors de la liaison avec la sémaphorine 3A, ce complexe de réception libère FARP2 et lui permet d'activer RAC1, une petite protéine G. RAC1 peut alors activer séquentiellement une série de kinases, PAK1 (*p21 activated kinase 1*), puis LIMK1 (*LIM domain kinase 1*), puis la cofiline, une protéine qui contrôle la polymérisation de l'actine (fig. 10-2B). RAC1 facilite également l'association de RND1, une autre petite protéine G, avec la plexine A1, ce qui stimule en retour l'activité GAP de cette dernière à l'égard de R-RAS, une autre petite protéine G impliquée dans la signalisation des intégrines (chapitre 11) (fig. 10-2C). L'inactivation de l'intégrine $\beta 1$ qui en résulte entraîne le détachement de la cellule de la matrice extracellulaire. L'interaction de RND1 avec la plexine A1 peut être inhibée par une autre petite protéine G, RHO-D, qui se fixe sur le même site de la plexine A1.

Le complexe NRP1-PLXNA1 peut, lors de son activation par la sémaphorine A3, activer des tyrosine kinases cytoplasmiques comme FYN, FES ou FER. Cette activation assure en retour la phosphorylation de la plexine A1 par CDK5, ce qui lui permet de recruter une protéine nommée CRMP2 (*Collapsin response mediator protein 2*) pour qu'elle soit phosphorylée (fig. 10-2D). Les protéines CRMP sont des agents de dépolymérisation des microtubules, et cette action de la sémaphorine A3 sur le cytosquelette s'ajoute à celles déjà mentionnées.

La plexine B1, récepteur de la sémaphorine 4D, est dimérique en absence de signal. La liaison avec la sémaphorine 4D entraîne, par un mécanisme qui reste à identifier, l'activation de petites protéines G comme RHO-D, RND1 ou RAC1, entraînant des effets similaires à ceux provoqués par la sémaphorine 3A sur le complexe de récepteur NRP1-PLXNA1. Toutefois, la sémaphorine 4D peut avoir aussi des effets diamétralement opposés : l'activation de son récepteur peut entraîner, d'une part, l'activation d'une protéine RHO-GAP, donc la désactivation de RHO, et d'autre part l'activation d'une protéine RHO-GEF, donc l'activation de RHO.

Altérations oncogéniques

Les sémaphorines jouent un rôle important dans la motilité et l'adhésion cellulaire et pour cette raison interviennent dans les phénomènes d'invasion, de métastase, d'angiogenèse et dans les phénomènes immunitaires. Dans la mesure où ces rôles peuvent être opposés selon la sémaphorine et le(s) récepteur(s) en cause, il n'est pas surprenant que les sémaphorines puissent, selon les cas, jouer un rôle positif ou négatif sur la croissance cellulaire et surtout sur la dissémination métastatique. Les sémaphorines 3B et 3F ont été perçues comme des suppresseurs de tumeurs ; la perte de fonction de SEMA3B, liée à une méthylation du promoteur ou à un polymorphisme de son gène, se rencontre fréquemment dans les cancers bronchiques non à petites cellules. Cette sémaphorine a expérimentalement un effet inhibiteur de la croissance cellulaire. Des observations analogues ont été réalisées sur la sémaphorine 3F qui a un effet anti-angiogénique et inhibe l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire, et pourrait à ce titre être anti-métastatique, de même que la sémaphorine 3A. Les sémaphorines 3C et 3E ont en revanche été perçues comme des favorisant l'angiogé-

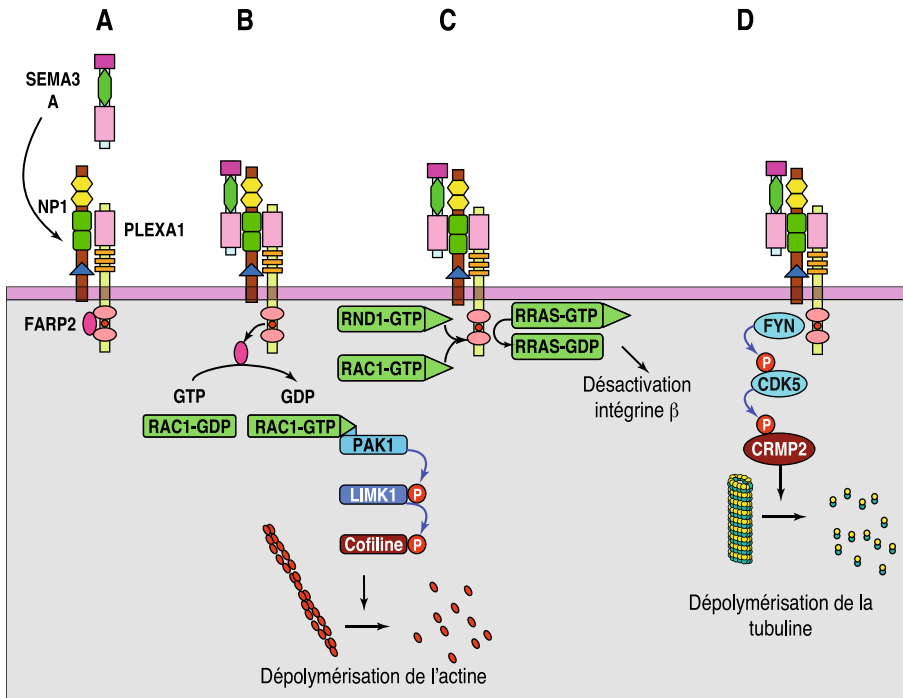


Fig. 10-2 – La voie de signalisation de la sémaphorine 3A.

A. La sémaphorine 3A reconnaît, sur la cellule cible, le complexe inactif neuropiline 1-plexine A1. Cette dernière est liée à la protéine FARP2, une protéine GEF.

B. L'interaction de la sémaphorine 3A avec le complexe de réception entraîne la libération de FARP2, qui échange le GDP de RAC1, une petite protéine G, pour du GTP ; RAC1 ainsi activée induit l'activation d'une série de kinases, PAK1 et LIMK1, aboutissant à l'activation de la cofiline, qui dégrade le cytosquelette d'actine.

C. RAC1 et RND1, d'autres petites protéines G, activent la fonction GAP de la plexine A1, qui va désactiver une autre petite protéine G, R-RAS. Cela entraîne une inactivation de l'intégrine β et le détachement de la cellule de la matrice extracellulaire.

D. La plexine A1 activée peut également activer des tyrosine kinases cytoplasmiques comme FYN, FES et FER. Le recrutement et la phosphorylation de CDK5 permettent ensuite l'activation de CRMP2, un agent de dépolymérisation des microtubules.

nèse et, par conséquent, la progression tumorale. La sémaphorine 4D, qui induit l'activation du RTK MET *via* la plexine B1, favorise l'invasion tumorale ; il en est de même pour le couple sémaphorine 5B-plexine B3.

Une surexpression des neuropilines a été observée dans de nombreux cancers, en liaison avec la progression tumorale : cancers digestifs, pulmonaires et mammaires entre autres. Expérimentalement, l'inhibition de NRP2 est susceptible de ralentir le développement de tumeurs colorectales. Les plexines A sont surexprimées également dans plusieurs types tumoraux (ovaire, côlon, sein) et des mutations de la plexine B1

ont été observées dans les cancers de la prostate. Toutefois, des résultats discordants ont été publiés, avec une diminution de l'expression de certaines plexines dans les cellules tumorales.

Cibles pharmacologiques

En raison de ses effets pléiotropes et redondants, la voie des sémaphorines apparaît particulièrement difficile à cibler. Le blocage des neuropilines par des anticorps ou des peptides exerçant un effet inhibiteur est en cours d'étude au niveau expérimental.

Bibliographie

- Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. (2009) Neuropilins in tumor biology. *Clin Cancer Res*; 15: 1860-4.
- Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. (2006) Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res*; 312: 584-93.
- Capparuccia L, Tamagnone L. (2009) Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment – two sides of a coin. *J Cell Sci*; 122: 1723-36.
- Ellis LM. (2006) The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*; 5: 1099-107.
- Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N *et al.* (2006) The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett*; 231: 1-11.
- Neufeld G, Kessler O. (2008) The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*; 8: 632-45.
- Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. (2008) Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J*; 411: 211-26.
- Roth L, Koncina E, Satkauskas S *et al.* (2009) The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell Mol Life Sci*; 66: 649-66.
- Suzuki K, Kumanogoh A, Kikutani H. (2008) Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. *Nat Immunol*; 9: 17-23.
- Tamagnone L, Comoglio PM. (2000) Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol*; 10: 377-83.
- Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. (2007) Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 23: 263-92.
- Trusolino L, Comoglio PM. (2002) Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*; 2: 289-300.
- Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. (2008) Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci*; 33: 161-70.

Chapitre 11

La voie des intégrines

Introduction

Les intégrines constituent un groupe de récepteurs hétérodimériques transmembranaires originaux, dont les ligands sont essentiellement les protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, etc.). Elles jouent un rôle structural en recrutant au niveau intracellulaire des complexes multiprotéiques qui assurent les jonctions cellule-matrice et cellule-cellule ; elles jouent également un rôle fonctionnel, car leur activation aboutit, *via* des kinases cytoplasmiques et des petites protéines G, à des signaux intracellulaires de prolifération et de migration. L'originalité des intégrines provient du caractère bidirectionnel de la signalisation qu'elles propagent : de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, comme toute voie de signalisation, mais aussi de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, pour moduler l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire et l'activité des métalloprotéinases matricielles. Les intégrines sont donc impliquées de façon importante dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

Les altérations des intégrines jouent un rôle important dans certaines maladies liées à la matrice extracellulaire (polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaques, psoriasis) ainsi que dans l'invasivité et le potentiel métastatique des cancers ; elles représentent une cible potentielle importante en oncologie et des essais cliniques sont en cours.

Les intégrines et leurs ligands

Organisation structurale des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques à un domaine transmembranaire, capables de se lier, par l'intermédiaire de leur partie extracellulaire, avec les constituants de la matrice extracellulaire. À partir de dix-huit sous-unités α (ITGA) et de huit sous-unités β (ITGB), un total de vingt-quatre intégrines différentes peuvent être assemblées (fig. 11-1). La partie extracellulaire des intégrines est beau-

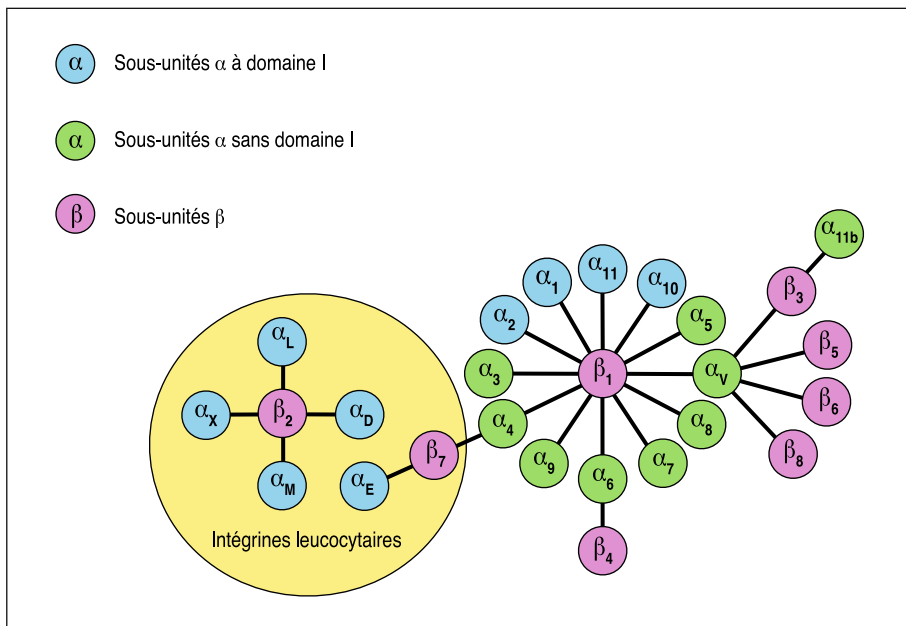


Fig. 11-1 – Assemblage des intégrines à partir de leurs sous-unités α et β .

Les dix-huit chaînes α et les huit chaînes β peuvent s'assembler de diverses façons pour former les 24 intégrines. Certaines intégrines sont spécifiquement leucocytaires et servent de récepteurs aux immunoglobulines. Certaines intégrines α ont un domaine d'interaction avec la matrice extracellulaire, d'autres n'en ont pas et la signalisation s'opère exclusivement par le domaine d'interaction de la chaîne β .

Le coup plus importante que la partie intracytoplasmique et peut être représentée sous la forme d'une tête globulaire N-terminale dominant deux jambes. La tête globulaire des chaînes α est faite d'un ensemble de sept domaines identiques appelés propulseurs (*propellers*) organisés comme les pales d'une hélice. Certaines intégrines contiennent en outre, en amont, un domaine analogue au facteur von Willebrand de type A (intégrines α I). Ce domaine permet la fixation d'un cation divalent, Ca^{2+} ou Mg^{2+} , qui interagit avec la matrice extracellulaire et porte le nom de MIDAS (*Metal ion-dependent adhesion site*).

Les chaînes α , après les domaines *propeller*, contiennent des domaines appelés *thigh* (cuisse), *genu* (genou), *calf 1* et *calf 2* (mollet), puis le domaine transmembranaire et le domaine intracytoplasmique (fig. 11-2A). Les chaînes β possèdent également une extrémité globulaire, le domaine β I, analogue du domaine α I mais constant, porteur d'un site MIDAS, qui fait suite à un repli de la partie N-terminale : ce domaine est inséré entre deux domaines homologues appelés domaines hybrides, eux-mêmes étant insérés entre deux domaines homologues PSI (*Plexins, semaphorins, and integrins*). Leur font suite quatre domaines EGF (*Epidermal growth factor*), précédant un domaine de queue TD (*Tail domain*), le domaine transmembranaire et le domaine intracytoplasmique (fig. 11-2A). Les domaines intracytoplasmiques des

chaînes α et β sont de petite taille, mais sont importants sur le plan fonctionnel ; l'interaction entre les domaines cytoplasmiques des deux chaînes est stabilisée par une liaison ionique entre un résidu arginine de la chaîne α et un résidu acide aspartique de la chaîne β .

Les intégrines, en absence de stimulation, présentent une structure courbée, la tête globulaire repliée vers la membrane (fig. 11-2B). Des messages d'origine intracellulaire leur permettent de se redresser pour se lier avec leur ligand. Cette liaison s'effectue au niveau du domaine αI des intégrines qui le possèdent, et pour les autres au niveau du domaine βI . Ces domaines existent sous deux conformations, l'une fermée, de faible affinité pour les ligands, et l'autre ouverte (fig. 11-2B), dans laquelle le domaine MIDAS est lié à un cation divalent qui permet une liaison ionique avec un résidu acide aspartique du ligand. La liaison des intégrines avec leurs ligands induit un changement de conformation au niveau des domaines cytoplasmiques des chaînes α et β . Les chaînes α sont phosphorylées de façon constitutive, alors que les chaînes β présentent des sites de phosphorylation permettant la régulation de leur activité. Diverses isoformes de protéine kinase C (PKC) sont impliquées dans la phosphorylation de résidus sérine et thréonine, mais il existe en outre des résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés.

Un point important dans la transmission des informations de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur repose sur l'agrégation (*clustering*) de nombreuses molécules

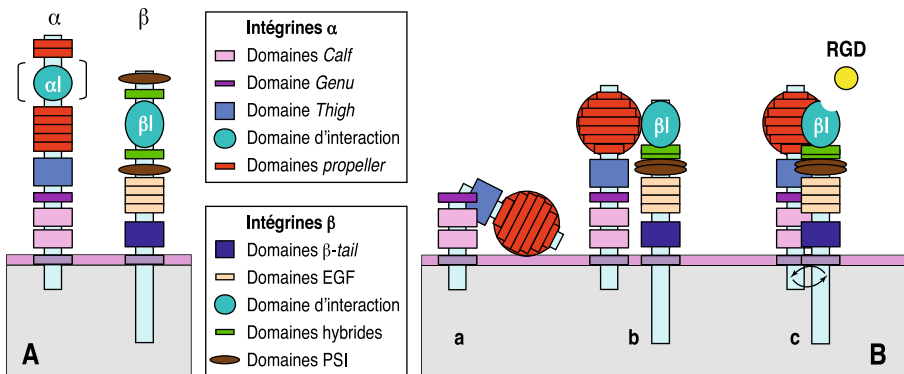


Fig. 11-2 – Structure des intégrines et conformation dans l'espace des chaînes α et β .

A. Représentation des domaines caractéristiques des chaînes α et β selon la séquence polypeptidique. Le domaine αI d'interaction avec la matrice extracellulaire n'est pas présent sur toutes les chaînes α .

B. Représentation dans l'espace des intégrines. Les domaines *propeller* des chaînes α sont organisés en une partie globulaire, la tête ; les domaines βI sont exposés par le repliement des domaines hybrides et des domaines PSI. (a) Les intégrines adoptent une conformation repliée en absence de stimulation ; (b) Sous l'effet d'une stimulation intracellulaire, les intégrines prennent une conformation dépliée ; (c) Elles peuvent alors démasquer un site de liaison avec la matrice extracellulaire qui permet l'interaction entre les domaines cytoplasmiques et la génération d'un signal.

d'intégrines : cette agrégation est requise pour que l'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire soit plus fort. Il existe en effet, tout au long des chaînes protéiques des protéines matricielles, de nombreux sites de liaison avec les intégrines qui nécessitent un nombre suffisant de molécules au niveau cellulaire pour une adhésion efficace. On distingue classiquement la signalisation assurée par le changement d'*affinité* (changement de conformation des domaines intracytoplasmiques) et celle assurée par le changement d'*avidité* (agrégation des molécules d'intégrine).

Les ligands des intégrines

Les principaux ligands extracellulaires des intégrines sont les protéines de la matrice extracellulaire : fibrinogène, fibronectine, facteur von Willebrand, collagènes, laminines, vitronectine. Certaines intégrines présentent une grande spécificité de ligand, d'autres sont au contraire peu sélectives. Plus particulièrement, une séquence tripeptidique caractéristique de ces protéines est reconnue par les intégrines α_V : la séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique). Cette séquence peut servir de guide pour le développement d'inhibiteurs compétitifs des intégrines ; elle est mise à profit pour désorganiser la matrice extracellulaire par certains venins de serpent. D'autres intégrines reconnaissent des séquences tripeptidiques différentes, comme IET et LDV, et certaines reconnaissent des structures tridimensionnelles plus complexes.

Certaines intégrines sont présentes spécifiquement sur la membrane des leucocytes où elles remplissent des fonctions liées à l'immunité. Ces intégrines, comme $\alpha_L\beta_2$ ou LFA1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) et $\alpha_M\beta_2$ ou MAC1 (de *Macrophage*), peuvent reconnaître des molécules de la superfamille des immunoglobulines, les ICAM (*Intercellular adhesion molecule*) et la VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*). Les ICAM, au nombre de cinq (de ICAM1 à ICAM5) sont des immunoglobulines transmembranaires leucocytaires dont la liaison avec les intégrines permet ainsi des phénomènes d'adhésion cellule-cellule (p. 143). Enfin, d'autres ligands extracellulaires des intégrines sont des polysaccharides bactériens et des protéines virales.

Du côté intracellulaire, les intégrines sont susceptibles d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la structure du cytosquelette ; ces protéines se lient avec les chaînes β des intégrines d'une part et avec l'actine d'autre part, reliant ainsi la matrice extracellulaire au cytosquelette. Les plus importantes sont les talines (TLN1 et 2), les kindlines (FERMT1, 2 et 3, pour *Fermitin family homolog*), les α -actinines (ACTN1-4), les filamines (FLNA, B et C), les cytohésines (CYTH1-4), les parvines (PARV α , β et γ) et les tensines (TNS). Ces protéines ne sont pas seulement des protéines de structure : elles possèdent des fonctions diverses qui sont impliquées dans la signalisation des messages reçus ou transmis par les intégrines. Des protéines adaptatrices sont également impliquées dans la transduction de ces messages : la vinculine (VCL), la paxilline (PXN), les protéines 14-3-3. L'agencement des intégrines avec ces protéines constitue les contacts focaux (*Focal adhesions*) (fig. 11-3).

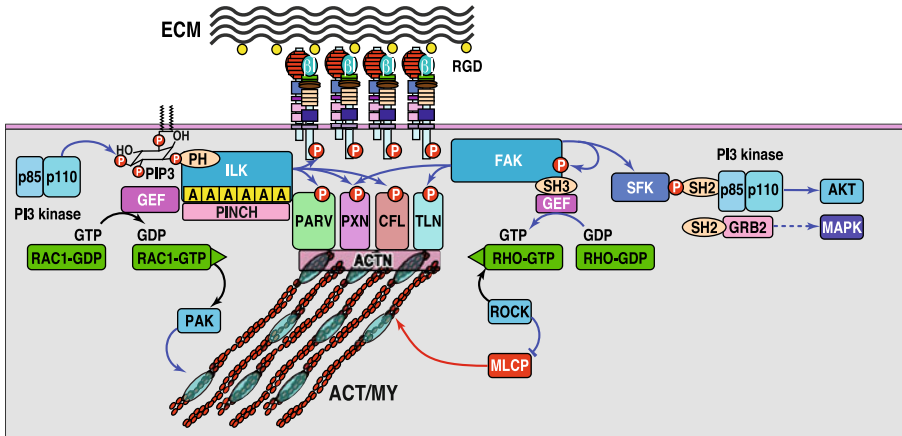


Fig. 11-3 – Voies de signalisation activées par les intégrines.

Au centre est représenté un contact focal (*Focal adhesion*), montrant l'association entre matrice extracellulaire (ECM) et cytosquelette d'actomyosine (ACT/MY), via l'assemblage entre intégrines et protéines intracellulaires associées, dont seules quelques-unes sont représentées (parvine, paxilline, cofiline, taline, actinine). Deux voies de signalisation au départ des intégrines sont représentées :

- à gauche, l'ILK (*Integrin-linked kinase*), recrutée par exemple par la PI3 kinase, phosphoryle la sous-unité β des intégrines ainsi que certaines protéines des contacts focaux ; elle active également les facteurs d'échange GEF de petites protéines G de la famille RHO, comme CDC42 et RAC1 qui, une fois activées, peuvent activer à leur tour des kinases comme PAK qui interviennent directement sur le cytosquelette ;
- à droite, la FAK (*Focal adhesion kinase*), recrutée par activation des intégrines, phosphoryle des protéines des contacts focaux, ainsi que des kinases cytoplasmiques de la famille SRC (SFK) ; des protéines adaptatrices sont capables d'activer les voies de prolifération comme la voie AKT et la voie de MAP kinases. La FAK active également, via un GEF, des petites protéines G de la famille RHO qui, une fois activées, peuvent activer à leur tour des kinases comme ROCK (*RHO-activated kinase*) capables d'agir directement sur le cytosquelette.

Les voies de signalisation au départ des intégrines

Les intégrines peuvent assurer deux types de signalisation : une signalisation *inside-out*, permettant à des messages intracellulaires d'activer ces récepteurs en vue de la reconnaissance et de la liaison de leurs ligands, et une signalisation *outside-in*, comme tous les récepteurs, qui permet la transduction de messages extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. Les intégrines apparaissent ainsi comme des récepteurs bidirectionnels. Ces deux actions sont toutefois indissociables : des signaux intracellulaires provenant de l'activation de RTK, de GPCR ou d'autres voies, activent dans un premier temps la fonction de récepteur des intégrines en induisant leur « redressement », et leur interaction avec leurs ligands extracellulaires active dans un deuxième temps la formation des contacts focaux et génère en outre divers messages intracellulaires. L'activation des intégrines aboutit à l'activation de diverses kinases cytoplas-

miques, selon le type cellulaire et la nature de l'intégrine, parmi lesquelles la tyrosine kinase FAK (*Focal adhesion kinase*) ou PTK2 (*Protein-tyrosine kinase 2*) et la sérine/thréonine kinase ILK (*Integrin-linked kinase*). Ces kinases engagent ensuite une signalisation aboutissant d'une part à l'activation de facteurs de transcription, et d'autre part à l'activation de petites protéines G. Ces voies de signalisation sont rassemblées sur la figure 11-3.

La FAK possède un domaine N-terminal FERM (du nom des sites *Four-point-one, ezrin, radixin and moesin*), un domaine central porteur de l'activité tyrosine kinase, et un domaine C-terminal FAT (*Focal adhesion targeting*) permettant sa liaison avec la paxilline et la taline, donc sa localisation au niveau des contacts focaux. L'activation de FAK par une intégrine débute par son autophosphorylation et le recrutement d'autres tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille SRC (SFK, *SRC family kinases*), qui complètent sa phosphorylation et sont réciproquement activées par FAK. Elle peut ensuite phosphoryler divers substrats au niveau des contacts focaux (actinine, paxilline). Elle possède des sites reconnus par les domaines SH2 et SH3 portés par des protéines adaptatrices. *via* les domaines SH3, elle permet d'activer une protéine d'échange de petites protéines G de la famille RHO (*RAS homolog*), comme p190^{RHOGEF} ou RGNEF (*RHO-guanine nucleotide exchange factor*). *via* des tyrosines phosphates reconnues par les domaines SH2, elle peut activer des protéines adaptatrices comme GRB2, qui active la voie des MAP kinases (chapitre 2), ou comme p85 (PIK3R1) qui active la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), ainsi que les protéines NCK (*Non-catalytic region of tyrosine kinase*), CRK (*Chicken tumor virus regulator of kinase*) et son associée CAS (*CRK associated substrate*), qui sont impliquées dans la motilité cellulaire, et SHC (*SH2 domain-containing protein*), impliquée dans des messages de prolifération et de survie.

L'ILK possède un domaine N-terminal qui lui permet de se lier, par l'intermédiaire de sites ankyrine (ANK), à des protéines PINCH (*Particularly interesting new Cys-His-rich protein*) ou LIMS1 (*LIM and senescent cell antigen-like domains 1*) dotées de domaines LIM (du nom des facteurs de transcription *LIN-11, ISL-1 and MEC-3*) ainsi qu'à une phosphatase ILKAP (*ILK-associated protein phosphatase*) et à la chaîne β de l'intégrine. Elle possède également un domaine central PH (*Pleckstrin homology*) qui lui permet d'être activée par le phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate (voir chapitre 3), et un domaine C-terminal de liaison avec les parvines (PARV- α , β et γ), qui sont elles-mêmes des protéines de liaison de l'actine et constituent avec ILK et PINCH des complexes appelés IPP. L'ILK fait ainsi partie directement des contacts focaux et ses interactions protéiques à leur niveau la protègent de l'ubiquitylation. Au niveau des contacts focaux, elle est responsable de la phosphorylation de ses partenaires, la chaîne β des intégrines, les parvines, la cofiline (CFL), la paxilline, etc. Au-delà des contacts focaux, ses substrats principaux sont les sérine/thréonine kinases AKT (chapitre 3) et GSK3 β (chapitre 7), ce qui montre le rôle de l'activation des intégrines dans les processus de survie et de prolifération cellulaire. Elle intervient également au niveau de l'adhésion et de la motilité cellulaires en activant, sans doute indirectement, des petites protéines G de la famille RHO, CDC42 (*Cell division cycle 42*) et RAC1 (*RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1*).

En aval des deux kinases activées par les intégrines, on trouve donc, outre d'autres kinases, des systèmes d'activation de petites protéines G de la famille RHO. Ces dernières interagissent directement avec le cytosquelette d'actomyosine et entraînent les modifications nécessaires à la migration cellulaire. Elles assurent la polymérisation de l'actine et l'assemblage des filaments polymérisés, permettant ainsi la formation des filopodes et des lamellipodes impliqués dans les mouvements cellulaires. CDC42 et RAC1 activent diverses protéines, comme la protéine WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) ou la PAK (*p21-activated kinase*). RHO-A induit l'assemblage et la contraction des fibres d'actomyosine par activation d'une protéine ROCK (*RHO-associated kinase*), cette dernière inhibant la phosphatase MLCP (*Myosin light chain phosphatase*).

Il existe des interactions évidentes entre la voie des intégrines et les voies de certains récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK, chapitre 1), en particulier par leur activation commune de la voie des MAP kinases (chapitre 2) et de la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), *via* les kinases dépendant des intégrines que sont ILK et FAK. La protéine NCK apparaît ainsi faire le lien entre les deux voies de signalisation : c'est une protéine adaptatrice dotée de domaines SH2 et SH3. La voie des intégrines est ainsi tout aussi importante pour le contrôle de la prolifération cellulaire que pour le contrôle de l'adhésion et de la motilité cellulaires. Les kinases cytoplasmiques ILK et FAK et les petites protéines G de la famille RHO sont les médiateurs privilégiés de ces effets.

Certaines intégrines sont capables d'induire l'apoptose lorsqu'elles ne sont pas liées à leur ligand matriciel extracellulaire. Elles se comportent ainsi comme de véritables « récepteurs à dépendance » (chapitre 18). Ce mécanisme appelé IMD (*Integrin-mediated death*) passe par l'activation de la caspase 8 ; il est le fait, en particulier, de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, une intégrine généralement associée à la prolifération cellulaire. Ce mécanisme de mort cellulaire induite par les intégrines non liées à la matrice peut être annulé par le recrutement de tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille SRC (SFK) qui induisent la prolifération et la survie cellulaires par l'activation des facteurs de transcription qu'elles sont susceptibles d'activer.

Altérations oncogéniques et cibles pharmacologiques

Il existe une surexpression des intégrines comme $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$ dans les cancers, et elles semblent jouer un rôle majeur dans la dissémination métastatique des tumeurs. Ces intégrines coopèrent avec les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et de la famille du PDGF, respectivement (chapitre 1), et jouent donc en outre un rôle positif sur la prolifération cellulaire. D'autres intégrines sont au contraire régulées négativement dans les cancers, comme $\alpha_2\beta_1$ qui active la voie de la p38 (chapitre 2), ou $\alpha_V\beta_6$ et $\alpha_V\beta_8$ qui contribuent à l'activation du TGF β (chapitre 5) : ces intégrines exercent donc un effet négatif sur la prolifération. Nous ne détaillerons pas les altérations oncogéniques de voies de signalisation en aval des intégrines comme la voie de MAP kinases (chapitre 2) ou la voie de la PI3 kinase (chapitre 3).

En raison de leurs actions sur la migration cellulaire, les intégrines sont au cœur de la transition épithélio-mésenchymateuse qui permet aux cellules cancéreuses d'origine épithéliale d'acquérir un phénotype mésenchymateux apte à la migration et à la dissémination. Ce sont à nouveau les intégrines $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$ qui, par leur activation du TGF β , peuvent favoriser l'invasivité tumorale. On observe dans les cancers des altérations de l'expression des intégrines, dans un sens différent selon leur rôle pro-oncogénique ou anti-oncogénique. Des mutations congénitales du gène de certaines intégrines sont rencontrées dans certaines maladies de système comme l'épidermolyse bulleuse (intégrine $\alpha_6\beta_4$) ou une dystrophie musculaire congénitale (intégrine $\alpha_7\beta_1$), mais il n'en a pas été identifié dans les cancers. Toutefois, en raison du rôle majeur des intégrines dans l'adhésion et la migration cellulaires, elles offrent une cible thérapeutique fondamentale pour le traitement des cancers. Trois approches ont été développées pour le ciblage des intégrines : des peptides mimant leur cible, des anticorps monoclonaux et des petites molécules.

Le tripeptide RGD est le point d'attachement de plusieurs intégrines, en particulier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, aux protéines de la matrice extracellulaire : des peptides mimant cette séquence sont susceptibles de bloquer la signalisation intracellulaire induite par l'activation des intégrines lors de leur liaison à la matrice. Des peptides naturels issus en particulier des venins de serpent, les désintégrines, ont été testés, mais on leur préfère des peptides synthétiques cycliques comme le cilengitide qui est en cours d'essais cliniques. Des petites molécules non peptidiques susceptibles d'interagir avec les intégrines au niveau de leurs sites de reconnaissance des protéines matricielles ont été également développées. Enfin, des anticorps dirigés contre des intégrines spécifiques sont en cours de développement, et cette approche apparaît prometteuse. Toutefois, s'il existe une possibilité de prolifération cellulaire indépendante de la liaison des intégrines α_v avec la matrice, les traitements visant à mimer cet attachement seront inefficaces.

La kinase FAK est surexprimée dans plusieurs types de cancers, et cette surexpression accompagne la progression métastatique des tumeurs sans que des mutations activatrices aient pu être identifiées. Le mécanisme de cette surexpression reste incompris, mais le fait que le promoteur de son gène possède des sites réprimés par p53 et activés par NF κ B suggère des interconnexions entre ces facteurs de transcription et l'expression de FAK. Le ciblage de FAK apparaît possible, puisque c'est une tyrosine kinase, et des inhibiteurs de type ATP mimétiques sont en cours d'essais thérapeutiques dans le traitement des cancers métastatiques. Comme pour tous les inhibiteurs de tyrosine kinase (voir chapitre 1) se pose le problème de leur spécificité. Les composés en développement ont en effet une activité croisée avec une autre tyrosine kinase cytoplasmique très voisine, PYK2 (*Prolin-rich tyrosine (Y) kinase 2*), ou avec un récepteur de l'IGF, l'IGF1R (*Insuline-like growth factor receptor 1*).

La kinase ILK est activée dans les cancers, en particulier ceux qui présentent un défaut mutationnel ou transcriptionnel de PTEN, qui constitue normalement un frein pour toutes les activités dépendant du phosphatidyl-3,4,5-triphosphate. Cette activation est attribuée à une surexpression, et il ne semble pas que des mutations activatrices de cette kinase aient été identifiées dans les cancers. L'inhibition d'ILK par

des approches antisens ou par des inhibiteurs de l'activité kinase est en cours de développement, car elle entraîne *in vitro* des effets importants sur la prolifération comme sur la migration cellulaires, en particulier dans les cellules ayant une mutation invalidante de PTEN. Toutefois, le caractère redondant des voies de signalisation activées par ILK permet de douter d'une efficacité majeure du ciblage d'ILK.

De quelques autres protéines d'adhésion

Les intégrines représentent l'archétype des molécules d'adhésion et des liens entre adhésion et signalisation. L'importance des phénomènes d'adhésion dans la migration cellulaire, donc dans les phénomènes d'invasion et de métastase, nous conduit à passer rapidement en revue quelques autres protéines d'adhésion cellulaire, qui jouent à la fois le rôle de récepteurs et de ligands (fig. 11-4).

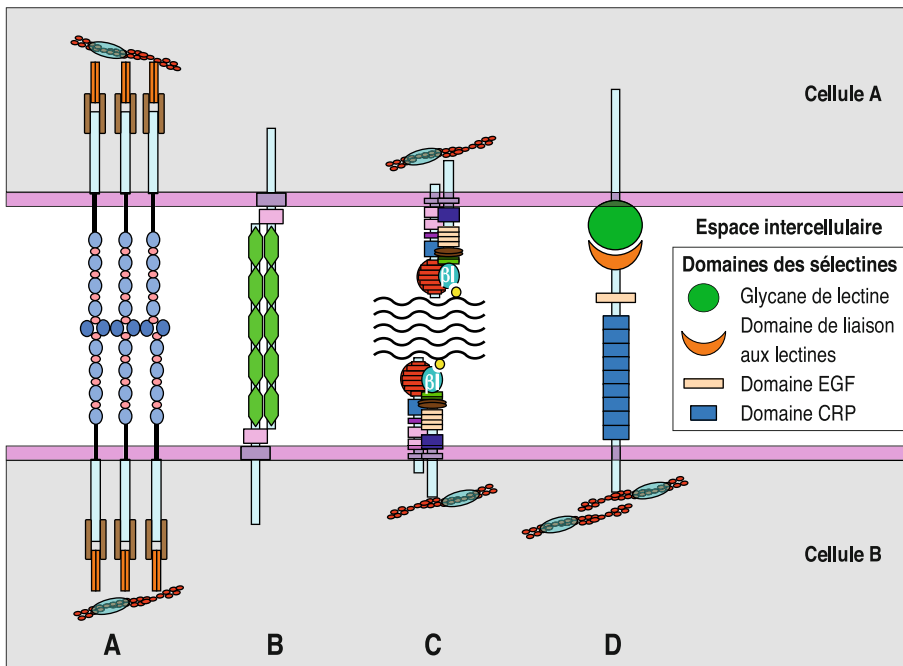


Fig. 11-4 – Molécules d'adhésion cellulaires.

Organisation générale de quatre principaux types de molécules d'adhésion : A : les cadhérines E ; B : les IgCAM ; C : les intégrines ; D : les sélectines.

Les cadhérines

Les cadhérines constituent une famille de molécules d'adhésion jouant un rôle majeur au niveau des jonctions intracellulaires, en liaison avec les ions Ca^{2+} . On distingue l'E-cadhérine (CDH1) dans les tissus épithéliaux, la P-cadhérine dans le placenta, etc. Elles permettent des interactions homotypiques entre cellules au niveau des jonctions adhérentes et des desmosomes. Elles possèdent au niveau extracellulaire une série de cinq domaines de liaison au Ca^{2+} , un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique raccordé au cytosquelette d'actine *via* des molécules de caténine. L'association entre molécules de cadhérine se fait au niveau de leur extrémité N-terminale où existent des domaines HAV (histidine-alanine-valine) et des résidus tryptophane interagissant avec des domaines hydrophobes. Au niveau intracellulaire, elles sont raccordées au cytosquelette d'actine *via* des molécules d' α -, β -, γ - et δ -caténine, l'ensemble constituant un complexe d'adhésion cellulaire (CCC, pour *Cytoplasmic cell-adhesion complex*).

L'E-cadhérine se comporte comme un suppresseur de tumeurs, ou plus exactement de métastases. Elle est réprimée lors de la transition épithélio-mésenchymateuse qui est l'événement initiateur de l'invasion tumorale ; les régulateurs transcriptionnels SNAIL et SLUG jouent un rôle majeur dans cette répression. Elle est alors remplacée par les cadhérines mésenchymateuses comme la N-cadhérine (*Neuronal cadherin*, CDH2) au cours d'un *cadherine switch*. Nous avons évoqué dans le chapitre 7 le rôle de l'E-cadhérine dans la disponibilité cytoplasmique de la β -caténine. Un autre rôle de l'E-cadhérine se joue au niveau de l'activation, par la δ -caténine, de petites protéines G de la famille RHO, RAC1 et CDC42, par l'intermédiaire de GEF comme VAV2 et TIAM1. L'activation de ces petites protéines G libère l' α -caténine, ce qui entraîne la destruction des CCC et le remaniement du cytosquelette, CDC42 induisant la formation de filipodes, RAC1 la formation de lamellipodes et RHO la formation de fibres de stress. Rappelons que ces petites protéines G sont également activées par les chimiokines (chapitre 6).

Les sélectines

Les sélectines (SEL) sont des protéines membranaires, avec une extrémité N-terminale extracellulaire, contenant un domaine de type lectine (liaison avec un glycan), un domaine *EGF-like*, des domaines CRP (*Complement regulatory protein*) un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracytoplasmique. Trois types tissulaires de sélectines sont rencontrés : endothélial (sélectine E), plaquettaire (sélectine P) et leucocytaire (sélectine L). Elles sont capables, *via* leur domaine lectine, de se lier à de nombreuses glycoprotéines membranaires de leucocytes, souvent des déterminants de groupes sanguins, en particulier celles porteuses d'un résidu fucose terminal. De tels ligands sont souvent exprimés de façon aberrante dans les cellules cancéreuses (voir Annexe C), et leur interaction avec les sélectines est susceptible d'être impliquée dans la progression tumorale. Trois niveaux d'interaction sont envisageables : (i) l'interaction des cellules tumorales avec les plaquettes et les leucocytes

peut former des embolies vasculaires ; (ii) l'interaction des cellules tumorales avec les cellules endothéliales peut moduler l'extravasation des cellules tumorales, donc leur migration métastatique ; (iii) cette même interaction peut stimuler la prolifération des cellules endothéliales, donc favoriser la néo-angiogenèse.

Les molécules d'adhésion cellulaire de la famille des immunoglobulines (IgCAM)

Une famille d'immunoglobulines membranaires est constituée de molécules d'adhésion cellulaire ; nous avons mentionné les ICAM et la VCAM comme ligands des intégrines (p. 136). Il existe également des NCAM neuronales et une PECAM au niveau plaquettaire et endothélial. Certaines sont des protéines à un domaine transmembranaire, d'autres sont ancrées dans la membrane grâce à un domaine GPI (glycosylphosphatidylinositol, Annexe C). Elles sont impliquées dans la réponse immune, le développement cérébral, la morphogenèse de tissus épithéliaux et des vaisseaux sanguins. Elles sont caractérisées par la présence, au niveau extracellulaire, de domaines *immunoglobulin-like* et de domaines fibronectine. Elles assurent une adhésion cellulaire par interactions homotypiques en trans et par interactions hétérotypiques avec d'autres molécules comme les intégrines, la N-cadhérine et des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Les NCAM sont en particulier responsables d'une signalisation intracellulaire, qui passe par l'activation de tyrosine kinases cytoplasmiques comme FYN, qui active ensuite la tyrosine kinase FAK. Les NCAM se comportent comme des suppresseurs de tumeurs et la diminution de leur expression est associée à l'oncogenèse et à la dissémination métastatique ; en association avec la N-cadhérine et le FGFR4, elles entraînent une stimulation de l'attachement des intégrines à la matrice extracellulaire (signalisation *inside out*). D'autres CAM sont également impliquées dans la progression tumorale des cancers, agissant parfois dans un sens pro-oncogénique, comme MCAM (*Melanoma-associated cell adhesion molecule*), ou dans un sens anti-oncogénique. Une classe particulière d'IgCAM, les nectines, joue un rôle important dans les jonctions adhérentes et la motilité cellulaire, en liaison avec la signalisation par les intégrines.

Bibliographie

- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*; 19: 495-507.
- Arnaout MA, Mahalingam B, Xiong JP. (2005) Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 21: 381-410.
- Cavallaro U, Christofori G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*; 4: 118-32.
- Desgrosellier JS, Cheresh DA. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*; 10: 9-22.

- Eble JA, Haier J. (2006) Integrins in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets*; 6: 89-105.
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM *et al.* (2009) Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta*; 1790: 431-44.
- Guo W, Giancotti FG. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5: 816-26.
- Hehlgans S, Haase M, Cordes N. (2007) Signalling *via* integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta*; 1775: 163-80.
- Hood JD, Cheresch DA. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*; 2: 91-100.
- Huveneers S, Truong H, Danen HJ. (2007) Integrins: signaling, disease, and therapy. *Int J Radiat Biol*; 83: 743-51.
- Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. (2006) ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 7: 20-31.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. (2007) Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol*; 25: 619-47.
- Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 56-68.
- Mitra SK, Schlaepfer DD. (2006) Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*; 18: 516-23.
- Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. (2008) Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9: 603-15.
- Zhao J, Guan JL. (2009) Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev*; 28: 35-49.

Chapitre 12

Les récepteurs *toll-like*, l'interleukine 1 et le NFκB

Introduction

Les récepteurs *toll-like* (TLR) constituent une famille de récepteurs impliqués dans les phénomènes d'immunité et d'inflammation, qui reconnaissent des facteurs dérivés d'agents infectieux (bactéries, virus) et des substances endogènes. Ils sont étudiés ici avec les récepteurs de l'interleukine 1 (IL1) et des interleukines de la même famille, IL18, IL33 et quelques autres. L'activation de ces récepteurs aboutit, après diverses étapes impliquant des kinases cytoplasmiques, à l'activation de facteurs de transcription, en particulier NFκB (*Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) qui permet la mise en œuvre de la réponse inflammatoire. Bien que NFκB puisse être activé en réponse à d'autres signaux, en particulier par AKT dans la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), nous l'étudierons dans ce chapitre. Les signaux générés par l'activation des récepteurs TLR/IL1R ont des effets sur la survie et sur la prolifération cellulaires : c'est la raison pour laquelle les voies qui aboutissent à ces signaux peuvent être détournées lors de l'oncogenèse.

Le système immunitaire contient deux types de récepteurs capables de reconnaître les composants bactériens ou viraux, que l'on appelle *Pattern-recognition receptors* (PRR) : les récepteurs membranaires *toll-like* et des récepteurs intracellulaires appelés NLR (*NOD-like receptors*, NOD signifiant *Nucleotide binding and oligomerization domain*). L'activation de ces NLR active à son tour les interleukines de la famille de l'IL1 qui, une fois sécrétées, entraîneront une réponse inflammatoire en reconnaissant les cellules équipées en récepteurs correspondants.

Les interleukines de la famille de l'IL1 et leurs récepteurs

Les cytokines de cette famille se distinguent des cytokines étudiées dans le chapitre 4, tant par leur structure que par la signalisation induite. La famille de l'IL1 comprend une dizaine de membres répartis en quatre groupes. On distingue, dans le groupe IL1, les isoformes IL1α et IL1β, ainsi que l'IL1RA (*IL1 receptor antagonist*) qui ne peut activer la voie de signalisation en aval et est en fait un inhibiteur de cette voie. L'IL18

et l'IL33 forment chacune un groupe ; un dernier groupe a été identifié plus récemment, comprenant les IL1F6, 8 et 9 et l'IL1F5, qui est un ligand antagoniste à l'image de l'IL1RA. Les interleukines de la famille de l'IL1 sont synthétisées sous forme de précurseurs qui sont activés par clivage protéolytique par la calpaïne pour l'IL1 α , et par la caspase 1 ou ICE (*IL1 converting enzyme*) pour l'IL1 β , l'IL18, l'IL33 et les ILF.

Les récepteurs de ces ligands sont au nombre de deux pour l'IL1 (IL1R1 et IL1R2) et pour l'IL18 (IL18R et IL18BP, pour *IL18 binding protein*), mais il n'en existe qu'un pour l'IL33 (T1/ST2 ou ST2L) et pour les IL1F (IL1RL2). Le récepteur IL1R1 possède un grand domaine cytoplasmique et est capable d'activer une signalisation intracellulaire, alors que l'IL1R2 est amputé d'une grande partie du domaine cytoplasmique et se comporte comme un récepteur leurre éventuellement soluble. Il en est de même pour l'IL18BP à l'égard de l'IL18. À ces récepteurs s'ajoutent des « protéines accessoires » (ILRAP), corécepteurs qui s'hétérodimérisent avec le récepteur « primaire » et forment des complexes ternaires IL-ILR-ILRAP nécessaires à l'activation de la voie de signalisation. Les IL1 α et β , l'IL33 et les IL1F utilisent l'IL1RAP et l'IL18 utilise l'IL18RAP. La combinatoire des ligands et récepteurs de l'IL1 est présentée sur la figure 12-1A. D'autres récepteurs encore « orphelins » ont été identifiés. Tous les récepteurs possèdent, au niveau extracellulaire, des domaines *immunoglobulin-like* et, au niveau intracellulaire des récepteurs actifs, un domaine TIR (*Toll-interleukin receptor domain*).

Les interleukines de la famille de l'IL1 sont des médiateurs fondamentaux de l'immunité et de l'inflammation. La plupart jouent un rôle pro-inflammatoire, auquel s'opposent d'une part les IL antagonistes (IL1RA et IL1F5) et d'autre part les récepteurs leurres, IL1R2 et IL18BP. L'activation de la caspase 1 est le phénomène initiateur de la mise en œuvre des IL1. Cette activation se déroule au niveau d'édifices supra-moléculaires, appelés « inflammasomes » au niveau desquels des protéines adaptatrices permettent l'activation par autoprotéolyse de la procaspase 1 en caspase active, à l'image des ces plates-formes que sont les apoptosomes qui permettent l'activation de la procaspase 9 (chapitre 18). Nous ne décrirons pas le rôle physiologique des IL1 mais signalerons simplement l'implication de l'IL1 β dans certaines maladies auto-immunes dans lesquelles la composante inflammatoire est importante, et qui ont reçu le nom de maladies « auto-inflammatoires ». Signalons également que de nombreuses stratégies de blocage de l'IL1 et de ses effecteurs sont développées en thérapeutique.

Les récepteurs *toll-like* et leurs ligands

Les récepteurs *toll-like* ont été découverts d'abord chez la drosophile, puis recherchés et identifiés chez les mammifères. Ils sont caractérisés par la présence de domaines intracytoplasmiques homologues de ceux des récepteurs de l'IL1, mais leurs domaines extracellulaires sont très différents : ils présentent des domaines riches en leucine et pas de domaines *immunoglobulin-like*. Les voies de signalisation en aval des récepteurs se sont également révélées communes. Il existe un total de neuf TLR, dont cinq sont présents au niveau de la membrane plasmique et quatre au niveau de membranes endosomales (fig. 12-1B). Leur activation résulte de leur dimérisation, généralement

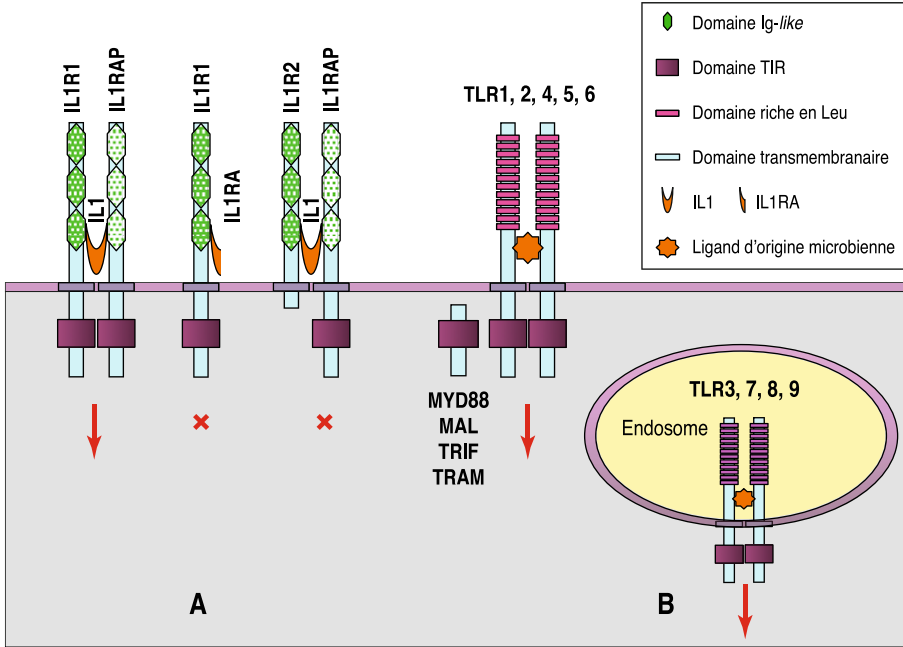


Fig. 12-1 – Les récepteurs de l'interleukine 1 et les récepteurs *toll-like*.

A. Les récepteurs de l'interleukine 1 (IL1R) transmettent un signal (flèche rouge) lorsque l'IL1 est fixée sur un complexe IL1R1-IL1RAP (*IL1 receptor accessory protein*). L'IL1RA (*IL1 receptor antagonist*) ne peut transmettre de signal. La fixation de l'IL1 sur un complexe IL1R2-IL1RAP ne peut transmettre de signal.

B. Les récepteurs *toll-like* sont localisés sur la membrane plasmique ou au niveau des endosomes. Ils induisent un signal lorsqu'ils sont homodimérisés, parfois hétérodimérisés (TLR1 ou 6 avec TLR2).

une homodimérisation, parfois une hétérodimérisation comme celle se produisant entre TLR2 et ses partenaires TLR1 et TLR6.

Les ligands capables d'activer les TLR sont donc d'origine extracellulaire ou d'origine intracellulaire. Ce sont essentiellement des produits d'origine microbienne, appelés de façon générique des PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) : lipopolysaccharides (LPS) de bactéries Gram négatives pour TLR4 ; lipoprotéines et acide lipoteichoïque pour TLR1, 2 et 6 ; flagelline pour TLR5 ; fragments d'acides nucléiques viraux, en particulier des ARN, pour les TLR intracellulaires 3, 7, 8 et 9. De nombreux ligands endogènes sont capables d'activer les TLR, surtout les TLR2 et 4 : protéines HSP (*Heat shock proteins*, voir Annexe C), protéine HMGB1 (*High mobility group box 1*), cristaux d'acide urique, surfactants, glycosaminoglycanes, protéines de la matrice extracellulaire comme les fibronectines ou le fibrinogène.

Sans entrer dans le détail des rôles physiologiques des TLR dans les mécanismes de l'immunité et de l'inflammation, signalons simplement que les TLR, à la surface des cellules épithéliales, sont au premier rang pour la reconnaissance des agents infec-

teux. Leurs rôles dans la lutte contre l'infection sont variés : ils sont capables de produire une réaction inflammatoire, d'activer la NADPH oxydase à l'origine de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, de recruter leucocytes et macrophages, de permettre l'activation de cytokines comme l'IL12, les interférons (chapitre 4) ou l'IL1, etc.

La transmission du signal à partir des TLR/IL1R

Généralités

Plusieurs voies de signalisation peuvent alors être ouvertes à partir de l'activation des IL1R et TLR : les voies des MAP kinases des types ERK, JNK et p38 décrites dans le chapitre 2, la voie du NFκB que nous étudierons ici, et la voie de l'IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) qui contrôle l'activité de cytokines (chapitre 4). L'activation de NFκB se produit à partir de la plupart des récepteurs ILR et TLR à l'exception du TLR3 ; l'activation d'IRF3 se situe essentiellement en aval des récepteurs TLR3 et 4.

Les signaux générés par les ILR et les TLR sont globalement semblables en raison du fait que les deux familles de récepteurs possèdent un domaine TIR dans leur partie intracytoplasmique. Ce domaine TIR est également présent au niveau d'une série de protéines adaptatrices qui sont recrutées par interactions homotypiques. La protéine MYD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) est une protéine adaptatrice commune à tous les ILR et TLR ; il existe en outre d'autres protéines adaptatrices spécifiques des TLR2 et/ou 4, en particulier MAL/TIRAP (*MyD88 adaptor-like/TIR domain containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing interferon β*) et TRAM (*TRIF related adaptor molecule*). L'activation des récepteurs par dimérisation est suivie du recrutement de ces protéines qui pourront à leur tour recruter des kinases cytoplasmiques, les IRAK (*IL1 receptor-associated kinase*).

Voie du NFκB

Dans la voie conduisant au NFκB à partir de l'activation de l'IL1R, du TLR4 ou des TLR endosomaux, il se produit dans un premier temps une autophosphorylation d'IRAK1, stimulée par IRAK4, qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), un des membres de la famille TRAF (chapitre 18), et d'une autre protéine adaptatrice, Pellino 1 (PELI1), l'ensemble formant le complexe 1 (fig. 12-2). Les différents composants cytoplasmiques du complexe 1 se détachent du récepteur et interagissent avec une kinase de type MAP3K (chapitre 2) liée à la membrane, TAK1 (*TGFβ-activated kinase 1*) et avec deux protéines adaptatrices, TAB1 et TAB2 (*TGFβ-activated kinase 1 binding protein*) pour former le complexe 2. Au niveau de ce complexe 2, formé d'IRAK1, de TRAF6, de TAK1, de TAB1 et de TAB2, IRAK1 peut phosphoryler TAK1, ce qui permet la dissociation de ce complexe de la membrane et son relargage dans le cytosol sous forme

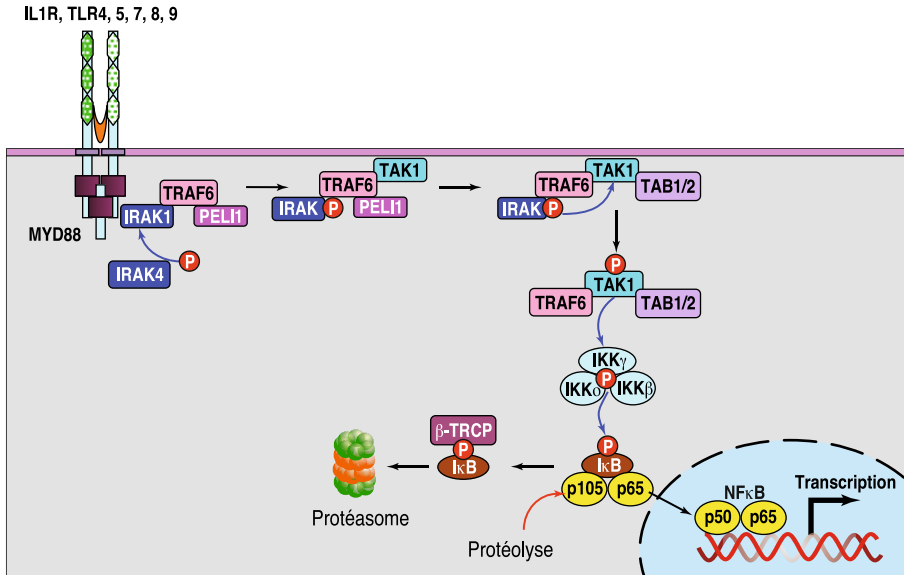


Fig. 12-2 – La voie de signalisation principale au départ des TLR et de l'IL1R.

Après l'intervention d'une protéine adaptatrice (MYD88), la kinase IRAK1 peut s'autophosphoryler et recruter d'autres protéines adaptatrices (TRAF6, PELI1). Le complexe 1 ainsi formé peut activer la kinase membranaire TAK1, phosphorylée par IRAK1, et donner naissance à un deuxième complexe qui recrute les protéines adaptatrices TAB1 et TAB2. Ce dernier complexe peut quitter la membrane et phosphoryler la protéine IKK, elle-même constituée de deux unités kinase, IKK α et β , et d'une unité régulatrice, IKK γ ou NEMO. IKK peut alors phosphoryler I κ B, ce qui la conduit vers le protéasome. Les facteurs de transcription de la famille NF κ B-REL sont libérés et leur séquence de localisation nucléaire démasquée : ils peuvent être transloqués dans le noyau et exercer leur fonction.

Représentée ici est la voie « canonique » ; il existe, selon le récepteur activé, d'autres modalités pour aboutir à l'activation de NF κ B ou des IRF ; ces modalités font appel essentiellement à d'autres protéines adaptatrices et à d'autres kinases capables de phosphoryler I κ B, mais le schéma général reste similaire.

d'un complexe 3 formé de TRAF6, TAK1, TAB1 et TAB2. La protéine TRAF6 est une ubiquitine ligase E3 (Annexe C) capable de s'auto-ubiquitinyler : cela ne la conduit pas vers le protéasome, mais au contraire lui permet d'activer le complexe 3. La kinase TAK1, ainsi activée, peut phosphoryler une kinase IKK (*I κ B kinase*), responsable de la formation du NF κ B. TAK1 étant une MAP3K peut phosphoryler également les MAP2K de la voie p38 et JNK (voir chapitre 2).

La kinase IKK est formée de trois sous-unités, dont deux possèdent une activité kinase (IKK α ou IKBKA et IKK β ou IKBKB) et la troisième une activité régulatrice (IKK γ ou IKBKG, ou encore NEMO, pour *NF κ B essential modulator*). Dans ce complexe, IKK phosphoryle une protéine I κ B (*Inhibitor of NF κ B*), associée par des domaines ankyrine aux précurseurs de NF κ B qui en possèdent également, au niveau

de deux résidus sérine ; cela lui permet d'être reconnue par une ubiquitine ligase E3 β -TRCP (*Transducing repeat containing protein*) de la famille SCF (*Skp1/Cullin/F-box*), qui la conduit à son ubiquitinylation et à sa destruction dans le protéasome. La destruction d'I κ B s'accompagne de l'activation par protéolyse des précurseurs de NF κ B et démasque un signal de localisation nucléaire (voir Annexe C), ce qui conduit à leur translocation dans le noyau et à la reconnaissance des promoteurs de leurs gènes cibles. Les kinases IKK ont des fonctions autres que celles conduisant à l'activation de NF κ B, non envisagées ici.

Il existe cinq facteurs homologues de dénominations diverses : deux facteurs NF κ B proprement dits, porteurs de domaines ankyrine d'interaction avec les protéines I κ B et appelés NF κ B1 (p50) et NF κ B2 (p52), qui existent d'abord sous forme de précurseurs inactifs (respectivement p105 et p100) activés par protéolyse, et trois facteurs REL (*Reticulo-endotheliosis viral oncogene homolog*), REL ou c-REL, REL-A (p65) et REL-B. Ils sont tous caractérisés par un domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN appelé RHD (*REL homology domain*). Les facteurs REL possèdent en outre des domaines d'activation de la transcription (fig. 12-3). Il faut donc que s'associent un facteur NF κ B et un facteur REL, et que cet hétérodimère migre dans le noyau, pour que la transcription des gènes cibles puisse intervenir. Les homodimères entre facteurs NF κ B sont de ce fait inefficaces.

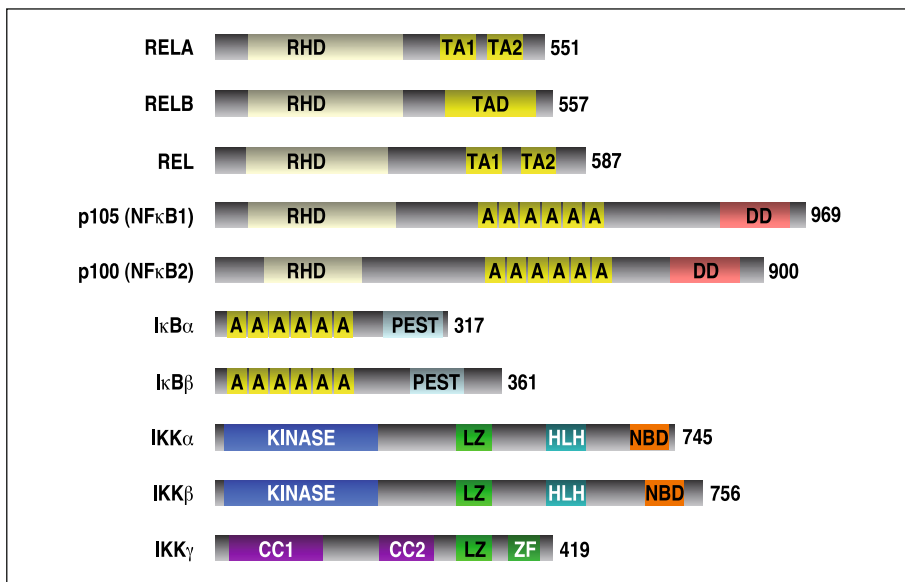


Fig. 12-3 – Structure générale des protéines NF κ B, I κ B et IKK.

Les trois types de protéines sont présentés, avec le nombre de leurs acides aminés et leurs domaines caractéristiques. RHD : *REL-homology domain* ; TAD : *Transactivation domain* (parfois divisé en TA1 et TA2) ; A : *Ankyrin repeat* ; DD : *Death domain* ; PEST : régions riches en proline, acide glutamique, sérine, thréonine ; LZ : *Leucine zipper domain* ; ZF : *Zinc finger domain* ; HLH : *Helix-loop-helix domain* ; NBD : *NEMO (IKK γ) – binding domain* ; CC : *Coiled-coil domain*.

Le NFκB est l'aboutissement principal de la voie des IL1R et TLR. Il est également produit par la voie de la PI3 kinase, *via* AKT (chapitre 3), par la voie des récepteurs lymphocytaires (chapitre 13) et par la voie des récepteurs de la famille du TNF (chapitre 18), selon des schémas d'activation voisins de ceux que nous avons vus à l'œuvre après activation des TLR ou des IL1R. À côté de la voie « canonique », il existe d'autres kinases capables de phosphoryler les kinases IKK, en particulier la MAP3K14 appelée NIK (*NFκB-inducing kinase*), *via* une autre protéine TRAF. Le NFκB active la transcription d'un grand nombre de gènes, impliqués dans les voies de l'apoptose (codant pour les protéines anti-apoptotiques BCL2, BCLXL, CIAP1 et CIAP2, XIAP, survivine, chapitre 18) ; dans les voies de la prolifération cellulaire (cycline D, MYC, chapitre 2) ; dans les voies de l'adhésion et de la motilité cellulaires (ICAM, VCAM, fibronectine, métalloprotéinases) ; dans les voies de l'inflammation (IL6, chapitre 4), dans les voies de l'angiogenèse (VEGF, COX2). Il induit également la synthèse de la protéine IκB qui, nous l'avons vu, le maintient à l'état inactif. Il exerce donc essentiellement des effets positifs sur la survie cellulaire et la prolifération.

Voie de l'IRF3

Dans la voie conduisant au facteur de transcription IRF3, c'est la protéine adaptatrice TRAM qui est recrutée par l'activation des récepteurs TLR3 au niveau des endosomes et TLR4 au niveau de la membrane plasmique. Ce sont les ARN viraux qui sont les ligands les mieux connus de ces récepteurs. De la même façon que dans la voie conduisant au NFκB, il se forme des complexes successifs qui se détachent de la membrane plasmique pour aboutir à l'activation du facteur de transcription IRF3. Interviennent dans ces complexes la protéine adaptatrice TRIF, un analogue de TRAF6, TRAF3, ainsi que des kinases analogues de l'IKK, nommées TBK1 (*TANK [TRAF-associated NFκB activator] binding kinase 1*) et IKKε (IKBKE). L'IRF3 est un facteur de transcription responsable de la transcription des gènes des interférons de type 1 (IFNα4, IFNβ) (chapitre 4) et des chimiokines RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*) ou CCL5, et CXCL10 (chapitre 6).

Altérations oncogéniques et cibles pharmacologiques

Au niveau des récepteurs

Les TLR constituent une voie de signalisation majeure de l'infection bactérienne et virale ; avec les récepteurs de l'IL1, ce sont des médiateurs essentiels de la réaction inflammatoire. Au niveau des muqueuses intestinales ou pulmonaires, ils ont un rôle de protection des épithéliums contre les substances chimiques ingérées ou respirées. Ils sont également importants pour l'homéostasie tissulaire, en particulier au niveau de la réparation et de la régénération des tissus. L'activation des TLR pourrait avoir un rôle bénéfique pour la protection des muqueuses contre les composés cancérogènes et pour la destruction des cellules tumorales grâce au recrutement de cellules

immunologiquement compétentes. Par ailleurs, l'activation du TLR3 active des voies pro-apoptotiques. L'action de certains « vaccins » antitumoraux pourrait passer par l'activation du TLR4 pour induire une immunité antitumorale de type T.

Cet aspect suppresseur de tumeurs de la voie des récepteurs TLR-IL1R est contrebalancé par des aspects pro-oncogéniques manifestes. La stimulation des TLR de lignées cellulaires tumorales conduit *in vitro* à une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaires. Expérimentalement, la progression tumorale peut être induite par des agonistes des TLR et la cancérogenèse peut être facilitée par les protéines adaptatrices en aval de ces récepteurs comme MYD88. Enfin, le rôle positif de la voie de signalisation ouverte par les TLR-IL1R sur l'angiogenèse contribue certainement à son rôle dans ce processus. Il ne semble pas que des mutations oncogéniques des récepteurs TLR ou IL1R aient été identifiées ; en revanche, des polymorphismes génétiques portés par des TLR sont associés à des différences significatives du risque de certains cancers épithéliaux (prostate, sein, côlon, nasopharynx).

La stimulation des récepteurs TLR est envisageable dans le traitement d'infections virales et de cancers. L'imiquimod, un dérivé de l'imidazoquinoline, est un agoniste du TLR7 et a été développé dans le traitement topique des infections à papillomavirus et des cancers associés, comme les néoplasies vulvaires intraépithéliales, ainsi que dans les carcinomes cutanés basocellulaires. Des agonistes du TLR9, oligodésoxynucleotides mimant les ADN simple brin d'origine virale, sont également en phase d'essais cliniques dans les carcinomes basocellulaires, le mélanome malin métastatique, les carcinomes rénaux et les lymphomes T cutanés. Ces adjuvants ont montré l'induction de réponses immunitaires, mais une activité antitumorale limitée.

Au niveau du facteur de transcription NFκB

En l'absence de mutations identifiées sur les diverses kinases impliquées dans la transduction des signaux reçus par les TLR-IL1R, c'est évidemment NFκB qui apparaît comme le modulateur des effets pro-oncogéniques de cette voie de signalisation, en raison de ses propriétés favorisant la survie et la prolifération cellulaires. Plusieurs mécanismes d'activation de NFκB dans des tumeurs humaines ou des lignées cellulaires tumorales ont été décrits :

- surexpression ou hyperactivité des différents récepteurs dont l'activation induit, entre autres choses, celle de NFκB (EGFR, ERBB2, MET, TNFR, intégrines, récepteurs des cytokines) ;
- surexpression ou hyperactivité des ligands de tels récepteurs (IL1β, cytokines, TNF, HGF, etc.) ;
- hyperactivité de kinases cytoplasmiques comme JAK, ABL (en liaison avec la translocation BCR-ABL), AKT (en liaison avec le caractère oncogénique de la voie de la PI3 kinase) ;
- mutations des protéines IκB, en particulier IκBα, plus rarement IκBε dans la maladie de Hodgkin, accompagnées de la perte de l'allèle non muté, selon les processus classiques d'activation des gènes suppresseurs de tumeurs ;

– mutations des gènes constitutifs du NFκB, en particulier du gène REL, dont des amplifications, délétions et mutations ponctuelles ont été décrites dans les lymphomes B. Des réarrangements du gène *NFKB2* ont été également signalés dans diverses hémopathies malignes.

Il existe par ailleurs des mutations germinales des gènes codant pour les protéines NEMO (IKKγ), IκBα, IRAK4, qui conduisent à des maladies congénitales diverses affectant le plus souvent le système immunitaire.

Le ciblage de NFκB fait l'objet de recherches importantes. Indirectement, l'inhibition du protéasome (Annexe C) apparaît pouvoir ralentir la destruction d'IκB en réponse à sa phosphorylation, donc diminuer l'activation de NFκB ; ce pourrait être un des mécanismes principaux de l'activité du bortezomib utilisé dans le traitement du myélome multiple. Les inhibiteurs des histones désacétylases (Annexe B) pourraient, eux, empêcher l'exécution des programmes transcriptionnels commandés par NFκB. En amont de NFκB, le ciblage de l'activité sérine/thréonine kinase des IKK est envisageable ; des petites molécules issues de produits naturels, comme la curcumine ou la génistéine, agiraient à ce niveau. L'interférence ARN (Annexe B) est capable expérimentalement d'inhiber la formation des IKK, de TAK1 ou de NFκB lui-même. Des peptides mimant la structure de NFκB ou de NEMO ont également fait preuve d'une activité potentielle. Enfin, comme une partie des effecteurs de NFκB se trouve au niveau de l'inflammation, les anti-inflammatoires ou les inhibiteurs de COX2 développés dans le cadre d'une thérapeutique anticancéreuse agissent peut-être, en dernier ressort, sur cette voie de signalisation. Dans tous les cas, c'est sans doute par potentialisation de la chimiothérapie cytotoxique plus que par leur action isolée que ces approches pourront trouver des applications en clinique.

Bibliographie

- Arend WP, Palmer G, Gabay C. (2008) IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*; 223: 20-38.
- Baud V, Karin M. (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*; 8: 33-40.
- Courtois G, Gilmore TD. (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*; 25: 6831-43.
- Dinarelli CA. (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*; 27: 519-50.
- El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. (2008) Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*; 27, 244-52.
- Gay NJ, Gangloff M. (2007) Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem*; 76: 141-69.
- Hayden MS, Ghosh S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*; 132: 344-62.
- Karin M, Greten FR. (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*; 5: 749-59.
- Kawai T, Akira S. (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19: 24-32.

- Lamkanfi M, Dixit VM. (2009) Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev*; 227: 95-105.
- Li X, Qin J. (2005) Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med*; 83: 258-66.
- Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. (2000) Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci*; 68: 241-58.
- Nakanishi C, Toi M. (2005) Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*; 5: 297-309.
- O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. (2009) Therapeutic targeting of toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*; 61: 177-97.
- O'Neill LA. (2008) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*; 226: 10-8.
- Perkins ND. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8: 49-62.
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. (2009) Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*; 9: 57-63.
- Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. (2008) Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med*; 233: 21-31.
- Shen HM, Tergaonkar V. (2009) NF-kappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis*; 14: 348-63.
- Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. (2008) The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol*; 26: 535-84.

Chapitre 13

Les voies des récepteurs lymphocytaires

Introduction

Les deux grands types de lymphocytes, les B, support de l'immunité humorale et les T, support de l'immunité cellulaire, expriment des récepteurs membranaires liés à leurs fonctions dans l'immunité : ils sont chargés de reconnaître des antigènes et d'apporter des réponses appropriées. À partir d'une multitude d'antigènes, une grande diversité de réponses peut se mettre en place ; entre les deux, les unités responsables de la fixation des ligands (antigènes) et celles responsables de l'initiation des signaux apparaissent au contraire très uniformes, constituées d'unités protéiques constantes, liées entre elles de façon non covalente.

Notre intention n'est pas de résumer en un chapitre toute l'immunologie, mais d'en extraire quelques informations relatives aux modalités de la signalisation lymphocytaire, depuis les récepteurs jusqu'aux effecteurs, en essayant de récapituler en quoi ces voies peuvent être mises à profit par les cellules cancéreuses et en quoi elles peuvent, en conséquence, servir de cibles à des traitements potentiels.

Les récepteurs des cellules B

Activation des récepteurs BCR

Le récepteur des cellules B (BCR, *B-cell receptor*) est un complexe multiprotéique comprenant une immunoglobuline (Ig) membranaire, élément de fixation de l'antigène, et un élément de signalisation fait de l'association hétérodimérique, *via* des ponts disulfure, d'une protéine Ig α et d'une protéine Ig β . L'élément de fixation de l'antigène est une Ig complète, associant une chaîne lourde H et une chaîne légère L, insérée dans la membrane plasmique au niveau de son fragment Fc et présentant vers l'extérieur ses fragments Fab N-terminaux (fig. 13-1). Ces derniers présentent une immense variété de séquences, obtenue par recombinaison génique et hypermutations somatiques ; ils déterminent la spécificité clonale des anticorps et sont capables de reconnaître et de fixer chacun un antigène original. Les protéines Ig α et Ig β ,

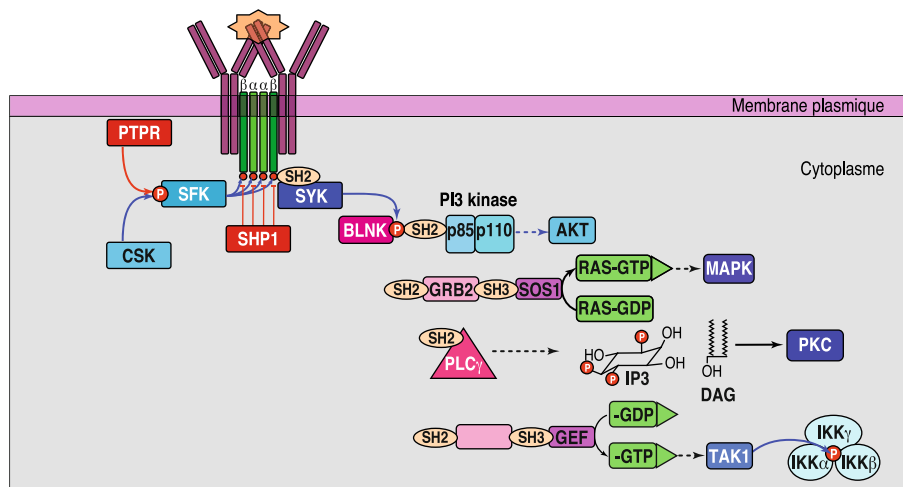


Fig. 13-1 – Récepteurs des cellules B et voies de signalisation associées.

Les récepteurs des cellules B sont constitués de deux chaînes d'immunoglobulines recevant le signal (antigène circulant) et d'un complexe formé de deux chaînes α et de deux chaînes β transmettant l'information. La phosphorylation de résidus tyrosine des chaînes α et β par des kinases de la famille SRC (SFK), en équilibre avec des phosphatases SHP, permet le recrutement de la tyrosine kinase SYK. Cette dernière phosphoryle des protéines adaptatrices comme BLNK qui permet l'activation, *via* la reconnaissance de leurs phosphotyrosines par des protéines à domaine SH2, la voie de la PI3 kinase, la voie des MAP kinases, les voies des seconds messagers IP3 et DAG. L'activation des récepteurs des cellules B permet également l'activation de la voie du NF κ B *via* TAK1, une MAP3K.

distinctes mais homologues, leur sont associées par des liaisons non covalentes. Elles contiennent chacune un motif d'activation contenant deux résidus tyrosine (ITAM, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) du côté cytoplasmique, dans le cadre d'une séquence consensus.

Des tyrosine kinases cytoplasmiques sont chargées de la phosphorylation de ces résidus tyrosine, ce qui permet ensuite leur reconnaissance par des protéines pourvues de domaines SH2 (voir chapitre 1). Ces tyrosine kinases appartiennent à la famille des SRC kinases (SFK, *SRC-family kinases*) : ce sont en particulier LYN (*Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*), FYN (*FES-YES related novel gene*), BLK (*B-lymphoid tyrosine kinase*) et LCK (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*). Ces kinases sont ancrées dans la membrane plasmique par une chaîne acylée ajoutée de façon post-traductionnelle (voir Annexe C). Leur activité est facilitée par l'agrégation locale des récepteurs au niveau de radeaux lipidiques (*rafts*) ; cette agrégation survient lors de l'activation des récepteurs, et permet l'agrégation des kinases. Des phosphatases comme SHP1 (*SH2-containing phosphatase 1*) peuvent être recrutées pour contrebalancer l'activation des kinases afin d'obtenir un degré de phosphorylation adéquat des ITAM. Les kinases, en dehors du complexe de réception, sont

elles-mêmes soumises à une balance entre leur phosphorylation par une kinase CSK (*c-src tyrosine kinase*) et leur déphosphorylation par une phosphatase CD45 ou PTPR (*Protein tyrosine phosphatase, receptor type*).

C'est une autre tyrosine kinase, SYK (*Spleen tyrosine kinase*), qui reconnaît les tyrosines phosphates des ITAM des protéines Igα et Igβ et peut à son tour phosphoryler des substrats, qui est responsable de la transduction du signal. Une protéine adaptatrice pourvue de domaines SH2, BLNK (*B-cell linker protein*), permet le recrutement des effecteurs de l'activation des BCR. Quant à l'antigène qui a activé le signal, il est internalisé avec le récepteur, envoyé vers des compartiments endosomaux pour être ultérieurement présenté aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Les protéines Igα et Igβ semblent en revanche rester en place pour maintenir une signalisation en absence du complexe de réception du signal. La figure 13-1 présente l'initiation de la signalisation par les récepteurs BCR.

Voies de transmission du signal

L'activation des BCR conduit à une grande diversité de voies de signalisation, tout particulièrement aux voies de prolifération nécessaires à l'expansion clonale des lymphocytes B. Nous ne ferons ici que les citer, en renvoyant le lecteur vers les chapitres où ces voies sont présentées en détail :

- voie ERK des MAP kinases (chapitre 2), atteinte par le recrutement de GRB2 par la protéine adaptatrice BLNK ; rappelons simplement que GRB2 recrute SOS1, la protéine GEF de RAS, lui-même activateur de la MAP3K appelée RAF ;
- voies p38 et JNK des MAP kinases (chapitre 2), atteintes par recrutement, par BLNK, de GEF de petites protéines G de la famille RHO, qui activent les MAP3K correspondantes ;
- voie de la PI3 kinase (chapitre 3), atteinte par recrutement de la protéine adaptatrice GAB, qui possède un domaine SH2 qui reconnaît les tyrosines phosphates de SYK et un domaine SH3 reconnu par la sous-unité régulatrice de la PI3 kinase ;
- voie des IKK (chapitre 12), atteinte d'une part par AKT, de la voie de la PI3 kinase, et d'autre part par l'activation de TAK1 par des petites protéines G activées après recrutement d'un GEF ;
- voie de l'IP3 et du DAG (chapitre 6), atteinte par activation de la PLCg, qui est pourvue (chapitre 1) de domaines SH2 ;

Toutes ces voies convergent vers des facteurs de transcription impliqués dans la survie et la prolifération lymphocytaires et étudiés dans les chapitres correspondants : MYC, ELK, JUN, NFκB, etc.

Altérations oncogéniques et cibles pharmacologiques

Il a été proposé il y a plus de cinquante ans que la stimulation antigénique pouvait contribuer à la genèse des lymphomes malins non hodgkiniens. De nombreuses situations reliant un état inflammatoire chronique à la survenue de lymphomes ont été

décrites. Par ailleurs, la stimulation antigénique des récepteurs BCR est une condition de la survie des lymphocytes B : dans ces conditions, l'expression de récepteurs BCR fonctionnels constituerait un moyen par lequel les anomalies moléculaires originales (translocations) pourraient s'exprimer dans une lignée lymphocytaire devenue tumorale. Cette stimulation de la prolifération lymphocytaire peut être le fait d'auto-antigènes dans la leucémie lymphoïde chronique. Il y aurait ainsi une « dépendance » des lymphocytes à l'égard de la stimulation antigénique et très peu de lymphomes malins n'expriment plus le récepteur BCR. Cette situation explique pourquoi le traitement anti-infectieux ou anti-inflammatoire d'infections chroniques sur lesquelles survient le lymphome s'accompagne d'une régression tumorale : c'est le cas des lymphomes associés au virus de l'hépatite C ou à l'infection gastro-duodénale par *Helicobacter pylori*. Dans ces deux situations, le traitement antiviral ou antibiotique représente une option thérapeutique importante du lymphome. De façon générale, toute approche envisageant l'élimination des antigènes qui permettent l'expansion des cellules tumorales pourrait se révéler féconde.

Les récepteurs des cellules T

Activation des récepteurs TCR

Le récepteur des cellules T (TCR, *T-cell receptor*) est lui aussi un complexe multiprotéique comprenant un élément de fixation de l'antigène et un élément de signalisation appelé CD3 :

- le module de reconnaissance de l'antigène est constitué de deux polypeptides transmembranaires, α et β , dont la partie extracellulaire, glycosylée, est analogue aux fragments Fab d'immunoglobulines ; chacune contient une partie constante et une partie variable associées par un pont disulfure. Le domaine transmembranaire est fait d'une simple hélice et le domaine intracellulaire est très court (de quatre à dix résidus).
- le module de signalisation est constitué de polypeptides transmembranaires hétérodimériques CD3 ($CD3\epsilon$ - $CD3\gamma$ et $CD3\epsilon$ - $CD3\delta$) et d'un polypeptide transmembranaire homodimérique, CD247, fait de deux chaînes ζ au domaine extracellulaire très réduit. La partie intracellulaire des protéines CD3 contient environ cinquante acides aminés et celle de la protéine CD247 en contient cent dix (fig. 13-2). Les chaînes ζ contiennent des résidus tyrosine phosphorylables, les ITAM.

La stœchiométrie du complexe de réception fait intervenir deux hétérodimères $TCR\alpha$ - $TCR\beta$, deux hétérodimères CD3 et un homodimère CD247 ($(\alpha\beta)_2 : \epsilon\gamma : \epsilon\delta : \zeta\zeta$). Les complexes sont en fait organisés en *clusters* multimériques localisés dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique.

Comme pour les BCR, la première étape de la signalisation est l'activation de kinases de la famille SRC (SFK), comme FYN et LCK. Ces kinases viennent phosphoryler les ITAM du CD247, ce qui permet de recruter une autre tyrosine kinase cytoplasmique, la ZAP70 (*Zeta-chain associated protein kinase 70 kDa*). Des protéines adaptatrices pourvues de domaines SH2 sont alors mises en jeu : LAT (*Linker for the*

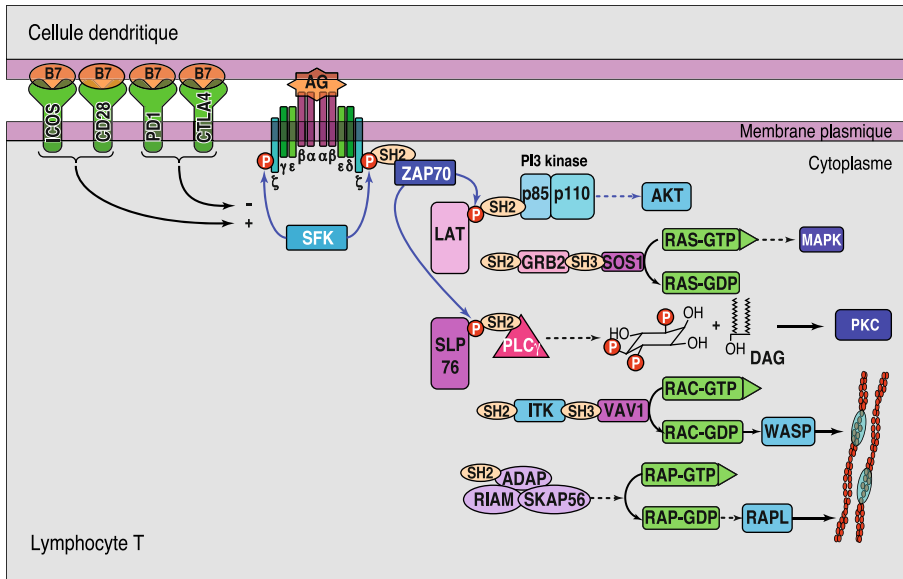


Fig. 13-2 – Récepteurs des cellules T et voies de signalisation associées.

Les récepteurs des cellules T sont constitués de deux groupes de chaînes $\alpha\beta$, qui reçoivent le signal des cellules présentatrices d'antigènes, du complexe CD3 (deux chaînes ϵ , une chaîne γ et une chaîne δ) et du complexe CD247 (deux chaînes ζ) qui transmettent l'information. La phosphorylation des chaînes ζ par une kinase de la famille SRC (SFK) permet le recrutement de la tyrosine kinase ZAP70, qui phosphoryle des protéines adaptatrices comme LAT et SLP76. Ces protéines activent, *via* la reconnaissance de leurs phosphotyrosines par des protéines à domaine SH2, la voie de la PI3 kinase, la voie des MAP kinases, la voie des seconds messagers IP3 et DAG. L'activation des récepteurs des cellules T permet également l'activation de voies originales mettant en jeu des petites protéines G de la famille RHO jouant un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire grâce à leurs actions sur le cytosquelette et grâce à leur possibilité d'activer les intégrines. Des récepteurs accessoires permettent de moduler la stimulation des cellules T *via* les protéines B7 des cellules dendritiques, soit positivement (CD28, ICOS), soit négativement (PD1, CTLA4).

activation of T cells) et SLP76 (*SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa*) ou LCP2 (*Lymphocyte cytosolic protein 2*). Ces protéines jouent le rôle d'intermédiaires pour le recrutement d'autres protéines de signalisation.

Outre le récepteur principal, TCR, les lymphocytes T possèdent des récepteurs accessoires, qui sont des immunoglobulines dont les mieux connues sont le CD28 et la protéine ICOS (*Inducible T-cell costimulator*) ; l'activation complète des cellules T requiert la fixation, sur ces récepteurs, de molécules costimulatrices parmi lesquelles les protéines B7, également apportées par les cellules présentatrices d'antigènes. Toutefois, d'autres récepteurs accessoires présents à la surface des lymphocytes T, analogues de CD28, ont un effet inhibiteur : ce sont CTLA4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) et PD1 (*Programmed death 1*). Ces récepteurs exercent un effet immunosuppresseur en bloquant la réception des molécules costimulatrices (fig. 13-2). La

signalisation par les récepteurs accessoires est en fait bidirectionnelle et peut se faire entre cellules T, ce qui est récepteur pour l'un étant ligand pour l'autre et vice et versa.

Un inhibiteur général de l'activation des lymphocytes T est une protéine CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*) qui est une E3 ubiquitine-ligase capable de reconnaître des phosphotyrosines : cette molécule a un effet inducteur de la tolérance immuno-logique et semble jouer un rôle majeur dans le contrôle du niveau d'activation des lymphocytes T, en particulier pour éviter la reconnaissance du soi et les phénomènes d'auto-immunité.

Signalons enfin qu'en dehors des récepteurs lymphocytaires spécifiques, les cellules T expriment le récepteur-canal du Ca^{2+} , CRAC (*Calcium release-activated calcium modulator*), qui permet l'activation de la calcineurine, une phosphatase qui active le facteur de transcription NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*). Ce facteur de transcription, malgré son nom, n'est pas spécifique des cellules T et est étudié chapitre 15.

Voies de transmission du signal

Une série de protéines effectrices peuvent exercer leurs effets grâce à leur recrutement par les protéines adaptatrices LAT et SLP76 ; certaines sont déjà présentées de façon détaillée dans d'autres chapitres, car elles ne sont pas spécifiques de l'activation lymphocytaire :

- la protéine GRB2 ouvrant la voie des MAP kinases *via* l'activation de RAS (chapitre 2) ;
- la protéine p85 ouvrant la voie de la PI3 kinase (chapitre 3) ;
- la PLC γ permettant la formation du DAG et de l'IP3, donc ouvrant la signalisation calcique (chapitre 6) ;
- la PKC θ , qui est à l'origine de la formation d'un complexe CBM, spécifique de l'activation lymphocytaire ; ce complexe est formé de la protéine CARMA1 (*CARD [Caspase recruitment domain] and membrane-associated guanylate kinase*), de la protéine BCL10 (*B-cell lymphoma 10*, une protéine adaptatrice à domaine CARD) et de la protéine MALT1 (*Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*). Ce complexe est à l'origine de l'activation de la kinase NIK (*NF κ B-inducing kinase*), qui est elle-même à l'origine de l'activation du facteur de transcription NF κ B (chapitre 12) ;
- la tyrosine kinase cytoplasmique ITK (*IL2-induced tyrosine kinase*), elle-même à l'origine du recrutement de la protéine VAV1 (du nom du sixième oncogène découvert par Barbacid), qui est un GEF permettant l'activation de petites protéines G de la famille RHO comme RAC1 et CDC42 ; ces protéines sont impliquées dans l'adhésion et la migration des cellules, par l'intermédiaire de protéines d'interaction avec le cytosquelette d'actine que l'on appelle les protéines WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome proteins*). Cette voie est à l'origine de l'activation intracellulaire des intégrines en promouvant leur agrégation (chapitre 11). L'ITK possède un domaine PH expliquant son recrutement à la membrane et son activation de la voie AKT ;

- la protéine RAP1 (*Regulator of adhesion and polarization 1*), qui est une petite protéine G activée par un complexe fait de trois protéines, recruté par SLP76 : ADAP (*Adhesion and degranulation-promoting adapter protein*), RIAM (*Rap1-interacting adaptor molecule*) et SKAP55 (*SRC kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa*) ; RAP1 est également un médiateur de l'activation intracellulaire des intégrines (chapitre 11) et joue un rôle au niveau de l'adhésion et de la migration cellulaires.

Altérations oncogéniques et cibles pharmacologiques

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans la surveillance immunologique des tumeurs et dans la mise en jeu de l'immunité antitumorale ; leurs capacités de survie et d'activation de leurs cibles, en particulier la production d'IL2, sont importantes pour inhiber la prolifération de certaines tumeurs comme les mélanomes malins. Malheureusement, la réponse immunitaire aux cancers est le plus souvent inefficace : les antigènes tumoraux majeurs de la plupart des cancers demeurent inconnus, empêchant toute thérapeutique spécifique. De plus, les cancers mettent en jeu toute une série de mécanismes pour échapper à la surveillance immunitaire de l'hôte : mutations modifiant les épitopes reconnaissables par les cellules T, absence d'expression de molécules co-stimulatrices, sécrétion de cytokines immunosuppressives, etc.

Les approches thérapeutiques envisageables sont peu nombreuses. L'effet immunosuppresseur du CTLA4 peut être combattu par des anticorps compétitifs, qui sont actuellement en développement dans le traitement du mélanome malin et des cancers du rein et de la prostate. Ces anticorps entraînent une augmentation de la production d'interféron γ par les lymphocytes T et de l'apoptose des cellules tumorales. Par ailleurs, on peut envisager de combattre les effets immunosuppresseurs de CBL en essayant d'agir sur son activité grâce à des petites molécules orientées, par exemple contre son domaine RING, ou encore par des approches à venir comme l'utilisation des ARN interférents.

Bibliographie

- Brezski RJ, Monroe JG. (2008) B-cell receptor. *Adv Exp Med Biol*; 640: 12-21.
- Burbach BJ, Medeiros RB, Mueller KL, Shimizu Y. (2007) T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev*; 218: 65-81.
- Cronin SJ, Penninger JM. (2007) From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity. *Immunol Rev*; 220: 151-68.
- Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT *et al.* (2004) B-cell antigen receptor signaling 101. *Mol Immunol*; 41: 599-613.
- Gomez-Rodriguez J, Readinger JA, Viorritto IC *et al.* (2007) Tec kinases, actin, and cell adhesion. *Immunol Rev*; 218: 45-64.
- Katzav S. (2007) Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett*; 255: 241-54.

- Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, Gogas HJ. (2008) Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol*; 26: 3445-55.
- Küppers R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*; 5: 251-62.
- Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. (2008) Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol Rev*; 224: 141-65.
- Rojo JM, Bello R, Portolés P. (2008) T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol*; 640: 1-11.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. (2009) T-cell activation. *Annu Rev Immunol*; 27: 591-619.
- Xue S, Gillmore R, Downs A, Tsallios A *et al.* (2005) Exploiting T-cell receptor genes for cancer immunotherapy. *Clin Exp Immunol*; 139: 167-72.
- Halliwell B. (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*; 401: 1-11.

Chapitre 14

Les voies des récepteurs nucléaires

Introduction

Les récepteurs nucléaires constituent une classe particulière de facteurs de transcription activés par un signal extracellulaire. Le signal extracellulaire est apporté par une substance hydrophobe, comme une hormone stéroïde, qui peut traverser la membrane cellulaire et ne requiert pas une molécule de surface pour le reconnaître et transmettre jusqu'au noyau l'information qu'il apporte. C'est le récepteur lui-même qui se charge de cette fonction et contrôle l'expression de gènes cibles après avoir reconnu et fixé son ligand. Les hormones stéroïdes diffèrent en cela des hormones polypeptidiques reconnues par des récepteurs couplés aux protéines G (chapitre 6).

Les récepteurs nucléaires sont les cibles de nombreux médicaments à visée métabolique et endocrinienne, qui peuvent être des agonistes ou des antagonistes puissants de leur activité. Deux grands types de cancer sont hormono-dépendants : les cancers du sein et les cancers de la prostate. Les récepteurs nucléaires des œstrogènes et des androgènes sont donc particulièrement importants en oncologie, parce que leurs altérations peuvent être en cause dans la genèse et l'évolution de ces cancers, et parce qu'ils constituent des cibles thérapeutiques importantes. Les traitements hormonaux des cancers du sein ont été historiquement la première « thérapie ciblée » des cancers. D'autres récepteurs nucléaires présentent également un intérêt majeur en oncologie.

Structure et fonction des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires, au nombre d'une cinquantaine, se rangent en trois classes principales (tableau 14-1) : l'une d'elles (NR3 pour *Nuclear receptor 3*) contient en particulier les récepteurs des hormones stéroïdes : œstrogènes (ER α et ER β , ou ESR1 et ESR2), progestérone (PGR), androgènes (AR), glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR). Une autre classe (NR1) rassemble les récepteurs des hormones thyroïdiennes, TR α et β , de la vitamine D (VDR), de l'acide rétinoïque (RAR α , β et γ), des oxystérols (LXR pour *Liver X receptor*), des acides biliaires (FXR, pour *Farnesoid*

Tableau 14-1 – Principaux récepteurs nucléaires et leurs ligands.

Nom usuel	Nomenclature	Principal ligand
TR α et TR β	NR1A1, NR1A2	Thyroxine
RAR α , RAR β , RAR γ	NR1B1, NR1B2, NR1B3	Acide rétinoïque tout- <i>trans</i>
PPAR α , PPAR β , PPAR γ	NR1C1, NR1C2, NR1C3	Acides gras, leucotriènes, prostaglandines
ROR α , ROR β , ROR γ	NR1F1, NR1F2, NR1F3	Cholestérol, sulfate de cholestérol
LXR α , LXR β	NR1H3, NR1H2	Oxystérols
FXR α , FXR β	NR1H4, NR1H5	Acides biliaires
VDR	NR1I1	Vitamine D
PXR, CAR	NR1I2, NR1I3	Xénobiotiques
RXR α , RXR β , RXR γ	NR2B1, NR2B2, NR2B3	Acide rétinoïque tout- <i>trans</i>
ER α , ER β	NR3A1, NR3A2	Céstradiol, tamoxifène
ERR α , β , γ	NR3B1, NR3B2, NR3B3	Diéthylstilbestrol
GR	NR3C1	Cortisol
MR	NR3C2	Aldostérone
PR	NR3C3	Progestérone
AR	NR3C4	Testostérone
ARH		Hydrocarbure aromatique (dioxine)

N.B. Seuls les ligands physiologiques sont mentionnés. Certains récepteurs admettent également des médicaments comme ligands. Il existe en outre de nombreux récepteurs orphelins non répertoriés dans ce tableau. L'ARH (Arylhydrocarbonre receptor) ou récepteur de la dioxine est un récepteur voisin des récepteurs nucléaires.

receptor), des xénobiotiques (PXR pour *Pregnane X receptor* et CAR pour *Constitutive androstane receptor*), ou encore des acides gras et de certains eicosanoïdes (PPAR α , β et γ , pour *Peroxisome proliferator-activated receptor*). La dernière classe (NR2) contient des récepteurs accessoires de l'acide rétinoïque (RXR, pour *Retinoid X receptors*). Chaque classe contient en outre des récepteurs apparentés, dont le ligand est resté inconnu à ce jour (récepteurs orphelins), comme ERR α , β et γ (*Estrogen receptor-related receptor*). La structure de quelques ligands des récepteurs nucléaires est présentée figure 14-1.

Les récepteurs nucléaires contiennent un domaine N-terminal d'activation de la transcription en absence de ligand, un domaine central de liaison à l'ADN (DBD, *DNA binding domain*) grâce à deux sites à doigt de zinc, un domaine charnière et un domaine C-terminal de reconnaissance et de fixation du ligand (LBD, *Ligand binding domain*), contenant le site AF2 de dimérisation et d'activation de la transcription en présence du ligand (fig. 14-2). Ils peuvent agir, selon les cas, en tant que monomères, homodimères ou hétérodimères et toujours, dans ce cas, avec un récepteur RXR. Ils reconnaissent au niveau de l'ADN une séquence appelée HRE (*Hormone responsive element*). Cette séquence est soit répétée en tandem, formant deux demi-sites identiques séparés par un nombre variable de nucléotides (généralement 3), soit répétée de façon inversée et palindromique, les deux demi-sites étant également séparés par un nombre variable de nucléotides. Dans les deux cas, chaque monomère se fixe sur l'un des deux demi-sites (fig. 14-2).

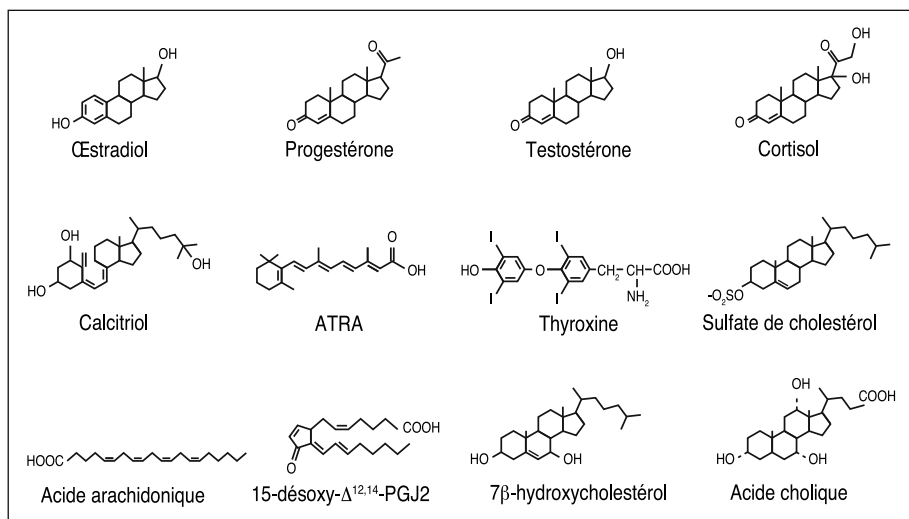


Fig. 14-1 – Structure des principaux ligands de quelques récepteurs nucléaires.

Les récepteurs et leurs ligands sont : ER (œstrogènes) ; PR (progestatifs) ; AR (androgènes) ; GR (glucocorticoïdes) ; VDR (vitamine D) ; RAR (rétinoïdes) ; TR (hormones thyroïdiennes) ; ROR (dérivés du cholestérol) ; PPAR α (acides gras) ; PPAR γ (prostaglandines) ; LXR (oxystérols) ; FXR (acides biliaries).

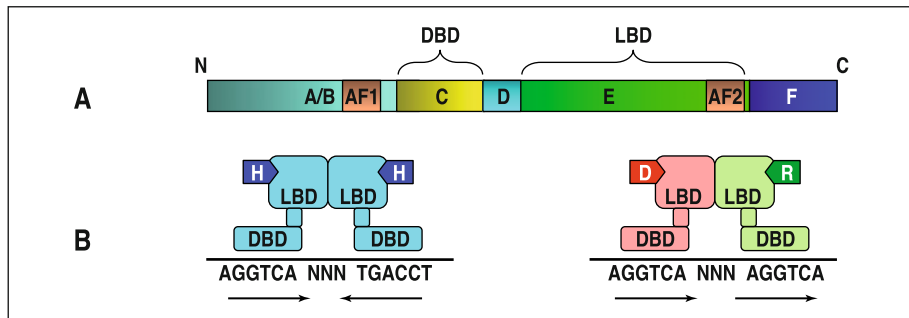


Fig. 14-2 – Structure générale des récepteurs nucléaires.

A. La séquence polypeptidique peut être subdivisée en zones A/B, C, D, E, F. Le domaine AB contient une séquence AF1 (*Activation function 1*) qui permet au récepteur d'avoir une (faible) activité constitutive en absence de ligand. Le domaine C est le domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA-binding domain*) contenant les motifs en doigt de zinc reconnaissant les HRE (*Hormone responsive elements*) des gènes cibles. Le domaine D est un domaine charnière (*Hinge*) permettant le repliement du récepteur lorsqu'il a fixé son ligand et s'est dimérisé. Le domaine E est le domaine de liaison du ligand (LBD, *Ligand binding domain*), qui contient également un site de dimérisation et la séquence AF2, site de transactivation dépendante du ligand.

B. L'interaction entre ligand et récepteur conduit à la fixation du récepteur activé sur une séquence de l'ADN. Dans le cas des récepteurs de la classe NR3 (à gauche), il y a homodimérisation entre les récepteurs activés par une hormone H et reconnaissance d'une séquence palindromique. Dans le cas des récepteurs de la classe NR1, il y a hétérodimérisation entre un récepteur spécifique (celui de la vitamine D par exemple) activé par son ligand D et le récepteur RXR ayant fixé l'acide 9-*cis*-rétinoïque R, avec reconnaissance d'une séquence en tandem.

La liaison du ligand avec le récepteur peut se faire dans le cytoplasme ; la translocation du récepteur activé dans le noyau est alors possible par démasquage d'une séquence de localisation nucléaire (Annexe C). Dans d'autres cas, le récepteur est en permanence localisé dans le noyau ; en absence de ligand, le LBD est lié à un corépresseur NCOR (*Nuclear receptor corepressor*) ; lorsque le LBD a reconnu et fixé un ligand, le domaine de transactivation est activé grâce à l'intervention d'un coactivateur NCOA (*Nuclear receptor coactivator*). Corépresseurs et coactivateurs ont pour mission de recruter les enzymes modificateurs des histones, qui contrôlent leur degré de méthylation et d'acétylation (Annexe B). La désacétylation des histones entraîne une compaction de la chromatine qui ne permet pas la transcription des gènes cibles, alors que leur acétylation facilite la transcription (fig. 14-3). Les récepteurs nucléaires peuvent exercer des effets indépendants de leur activité de facteurs de transcription : certains sont capables, dans le cytoplasme, d'activer des voies de signalisation comme les voies des MAP kinases et de la PI3 kinase (chapitres 2 et 3) ou les voies liées à la libération du Ca^{2+} dans le cytosol (chapitre 6).

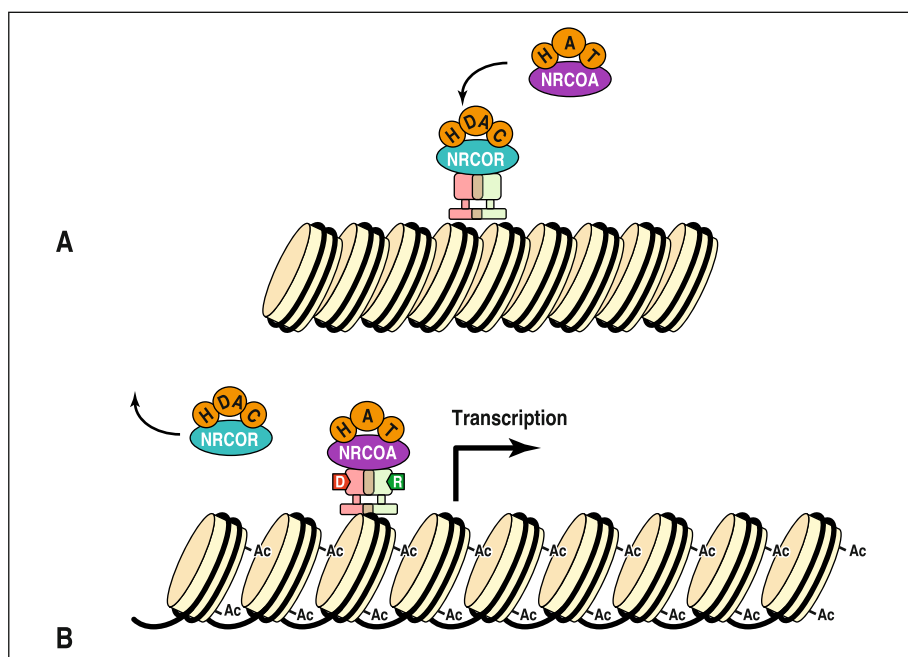


Fig. 14-3 – Activation de la transcription par les récepteurs nucléaires.

A. En absence de ligand, l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire est inhibée par des corépresseurs NRCOR associés à une activité histone désacétylase HDAC. La chromatine est compacte et ne permet pas la transcription.

B. Après avoir fixé leurs ligands, les récepteurs s'associent à un coactivateur NRCOA qui recrute une activité histone acétyltransférase HAT; la chromatine est relaxée et la transcription des gènes cibles peut avoir lieu.

Il est impossible de dresser une liste, même succincte, des gènes dont la transcription est activée par les récepteurs nucléaires. Plusieurs centaines de gènes possèdent en effet, au niveau de leur promoteur, des *responsive elements* spécifiques des différents récepteurs activés. La recherche des gènes cibles peut être réalisée *in silico*, à l'aide d'algorithmes d'identification de ces séquences dans les promoteurs de l'ensemble du génome ; ou encore en se fondant sur les profils d'expression des gènes avant et après traitement par un ligand spécifique. Les gènes transcrits par les récepteurs activés reflètent bien sûr les caractéristiques de l'action des hormones, dans les domaines du métabolisme, de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Les œstrogènes ou les androgènes entraînent, par exemple, une prolifération des cellules qui expriment les récepteurs correspondants, ce qui peut être mis à profit par les cancers hormonodépendants.

Récepteurs des hormones stéroïdes

Cinq classes d'hormones stéroïdes activent des récepteurs nucléaires : œstrogènes, progestatifs, androgènes, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. En absence de ligand, ces récepteurs sont associés dans le cytoplasme à des protéines chaperons HSP (*Heat shock proteins*) qui les maintiennent à l'état inactif. La fixation du ligand entraîne le départ de la protéine HSP, l'homodimérisation du récepteur et sa translocation dans le noyau. Le dimère reconnaît alors la séquence cible HRE et induit la transcription des gènes correspondants.

Récepteurs des œstrogènes et de la progestérone

L'action des œstrogènes sur la croissance des cancers du sein et de l'endomètre est connue de longue date, puisque la castration a été proposée il y a plus d'un siècle comme traitement des cancers du sein. Les œstrogènes favorisent la prolifération des tissus qui expriment le récepteur ER α (NR3A1), ce qui est le cas de 70 % des cancers du sein. Les œstrogènes utilisés comme traitement hormonal substitutif de la ménopause ont entraîné une augmentation de l'incidence des cancers du sein qui a tendance à diminuer depuis qu'une mise en garde internationale de leur utilisation a été faite. Le second récepteur des œstrogènes, ER β (NR3A2), est un régulateur négatif du récepteur ER α dans le tissu mammaire normal, en modulant son activité transcriptionnelle par hétérodimérisation d'une part, et en diminuant son taux de transcription d'autre part.

Depuis les années 1970, une thérapie hormonale ciblant cette relation entre œstrogènes et croissance tumorale des cancers du sein a été mise en place : le tamoxifène et ses dérivés, désignés sous le nom générique de SERM (*Selective estrogen receptor modulators*). Ces composés sont des anti-œstrogènes qui agissent, selon les tissus, comme antagonistes forts et/ou agonistes faibles de l'œstradiol : après liaison au récepteur, ils empêchent un certain nombre de ses effets transcriptionnels, mais pas obligatoirement tous. À côté des SERM sont les SERD (*Selective estrogen receptor*

downregulation) comme le fulvestrant, qui se lie au récepteur ER α avec une affinité comparable à celle de l'œstradiol mais sans aucune activité agoniste, et diminuent l'expression du récepteur au niveau transcriptionnel. Outre les SERM et les SERD, qui agissent sur le récepteur ER α , on dispose d'un autre abord thérapeutique pour les cancers du sein hormono-dépendants : les inhibiteurs de l'aromatase qui agissent au niveau de la synthèse même des stéroïdes en C18 à partir des stéroïdes en C19 (androgènes).

Les traitements hormonaux ne peuvent être bien sûr efficaces que si le tissu mammaire exprime le récepteur ER α . Toutefois, 30 % environ des cancers exprimant le récepteur ER α sont hormono-résistants. Pendant plus de vingt ans, une technique biochimique, évaluant la capacité de liaison de l'œstradiol avec son récepteur dans la fraction cytosolique, a restreint la prescription de tamoxifène aux seules patientes dont la tumeur exprimait le récepteur. Ce dosage a été remplacé par une détection immunohistochimique plus rapide et moins coûteuse, mais certainement moins quantitative. Le récepteur ER β ne semble pas fréquemment exprimé dans les cancers du sein ; il n'est pas, en tout cas, évalué de façon systématique comme l'est le récepteur ER α . Il devrait, en toute logique, être associé à une absence de dépendance hormonale des cellules cancéreuses. Le récepteur de la progestérone (PGR, NR3C3) est également évalué en routine dans les cancers du sein. Son expression est fortement corrélée à celle du récepteur des œstrogènes, mais les deux récepteurs sont parfois dissociés ; il semble que la présence simultanée des deux récepteurs soit nécessaire à l'activité du tamoxifène, auquel les tumeurs ER $^{+}$ mais PR $^{-}$ sont moins souvent sensibles que les tumeurs ER $^{+}$ et PR $^{+}$.

Même si leur présence dans la tumeur est un phénomène promoteur de l'oncogénèse, il est difficile de considérer comme une « altération oncogénique » la présence de récepteurs des œstrogènes dans les cancers du sein, puisque c'est le cas de la glande normale. De rares mutations du récepteur ER α accompagnent la résistance au tamoxifène. Une forme variante du récepteur ER α amputée de séquences initiales d'activation de la transcription en absence de ligand, stimulerait la prolifération cellulaire *via* une activation des voies des MAP kinases et de la PI3 kinase en dehors des anomalies des récepteurs, certaines anomalies des corégulateurs des récepteurs des œstrogènes présentent des altérations oncogéniques. C'est le cas du coactivateur NCOA3, qui avait reçu le nom d'AIB1 pour *Amplified in breast cancer*. Une diminution de l'expression des corépresseurs pourrait accompagner la résistance au tamoxifène.

La perte de l'expression du récepteur ER α dans les cancers du sein s'accompagne d'un pronostic défavorable s'ajoutant à la perte de l'hormono-sensibilité. Plusieurs mécanismes ont été invoqués pour expliquer cette absence d'expression, parmi lesquels la méthylation du promoteur, une modification du niveau d'activité des facteurs de transcription du gène *ESR1*, la dégradation des ARNm, l'intervention de microARN, ou la dégradation du récepteur *via* le protéasome. L'inhibition des voies de prolifération en aval des récepteurs à activité tyrosine kinase comme ERBB2 (chapitre 1-3) semble susceptible de restaurer l'expression du récepteur ER α .

Récepteurs des androgènes

De façon analogue, les cancers de la prostate sont stimulés par les androgènes en raison de l'expression élevée du récepteur des androgènes (AR, NR3C4) dans le tissu prostatique. Ces cancers sont donc sensibles, eux aussi, à un traitement hormonal : castration, qui élimine les sécrétions androgéniques ; agonistes de l'hormone hypothalamique LH-RH qui conduisent à un épuisement rapide des sécrétions androgéniques par les gonades ; composés anti-androgènes qui prennent la place de la testostérone sur le récepteur. Toutefois, l'effet antitumoral de ces traitements s'épuise progressivement et la tumeur devient hormonorésistante lorsque surviennent des formes mutantes du récepteur qui remplacent leur stimulation androgénique par une stimulation autre.

Une forme particulière de cancers du sein, les tumeurs apocrines, sont développées à partir de glandes particulières qui expriment le récepteur des androgènes et dont la prolifération peut être inhibée également par des anti-androgènes. L'identification moléculaire de ces tumeurs pourrait permettre de mettre en œuvre ce type de traitement dans ces cancers du sein.

Récepteurs des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes, *via* leur interaction avec leur récepteur GR (NR3C1), présentent essentiellement des activités anti-inflammatoires et immunosuppressives largement utilisées en thérapeutique. Ils ont également la propriété d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses dans les hémopathies malignes et font depuis longtemps partie de protocoles de traitement des leucémies, des lymphomes et des myélomes. La fixation du GR activé sur un GRE entraîne l'activation d'un certain nombre de gènes cibles et la répression de la transcription de gènes cibles impliqués dans l'immunité et l'inflammation. Par ailleurs, le GR activé est susceptible d'interagir avec des facteurs de transcriptions comme AP1 (chapitre 2) et NFκB (chapitre 12), formant des complexes de répression transcriptionnelle qui conduisent à l'inhibition des voies activées par ces protéines (prolifération et survie cellulaire principalement). Plus de cinquante gènes impliqués dans la régulation négative de l'apoptose (chapitre 18) peuvent être ainsi impliqués dans l'apoptose massive des cellules leucémiques ou lymphomateuses induite par les glucocorticoïdes. La perte de certaines de ces voies accompagne la résistance aux glucocorticoïdes. Des mutations du GR ont été décrites dans les lignées leucémiques, mais la preuve de leur implication dans la résistance clinique ne semble pas avoir été apportée.

Récepteurs des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes, thyroxine (T4) et tri-iodothyronine (T3), sont les ligands des récepteurs TRα (THRA ou NR1A1) et TRβ (THRB ou NR1A2), chacun pouvant exister sous deux isoformes, à la suite d'un épissage alternatif. L'isoforme

TR α 2 est un faux récepteur qui ne fixe pas ses ligands et se comporte comme un inhibiteur de l'action hormonale. Les récepteurs subissent une hétérodimérisation avec le récepteur RXR ; en absence de ligand, ils sont fixés sur l'ADN au niveau de leur *responsive element* TRE et répriment la transcription grâce au corépresseur NCOR2 ou SMRT (*Silencing mediator of retinoic and thyroid receptor*). Après fixation du ligand, le TR recrute des coactivateurs qui remplacent les corépresseurs et la transcription des gènes cibles est possible après remodelage de la chromatine. Il existe également des TRE « négatifs » qui répriment la transcription de gènes cibles une fois le ligand fixé. Enfin, les hormones thyroïdiennes exercent des effets indépendants du TRE, en particulier par des interactions au niveau membranaire avec d'autres systèmes de signalisation.

Le récepteur thyroïdien est l'homologue de l'oncogène viral *erb-A*, coresponsable avec l'oncogène viral *erb-B* de l'érythroblastose aviaire et capable de bloquer la différenciation des progéniteurs érythroïdes. Il existe des altérations des gènes TR dans les cancers humains, leucémies et carcinomes, de nature génétique ou épigénétique : mutations ponctuelles, réarrangements géniques, méthylation anormale du promoteur, perte d'hétérozygotie. Les hépatocarcinomes présentent en particulier des formes mutantes de TR α ou TR β qui se comportent comme des dominants négatifs. Certains travaux tendent à montrer que l'activation des TR induit un effet inhibiteur sur la signalisation au départ des protéines RAS. L'ensemble de ces observations suggère que les TR ont un rôle suppresseur de tumeurs, malgré le fait que T3 ait un effet mitogène sur le foie. Une exploitation pharmacologique de ces observations paraît difficile en raison des difficultés prévisibles de toute interaction avec les activités hormonales puissantes de T3 et T4.

Récepteurs de la vitamine D

Le métabolite actif de la vitamine D est une véritable hormone formée, après photoactivation de précurseurs stéroïques apportés par l'alimentation, grâce à des hydroxylations successives sur les carbones 1 et 25 pour former le 1 α ,25-dihydroxycholecalciférol ou calcitriol ; ce composé exerce de nombreux effets physiologiques, au premier rang desquels on doit citer l'absorption intestinale de calcium et la minéralisation osseuse. Le calcitriol se fixe à un récepteur nucléaire appelé VDR (*Vitamin D receptor*) ou NR1I1, qui doit s'hétérodimériser avec le RXR pour reconnaître les séquences cibles sur l'ADN. En absence de ligand, le dimère est fixé sur le VDRE (*Vitamin D responsive element*) et la transcription de gènes cibles est inhibée grâce à son association avec le corépresseur NCOR2 ou SMRT (*Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor*). Dans cet état, les histones sont désacétylées et la compaction de la chromatine ne permet pas de transcription (Annexe B). La fixation du ligand entraîne le remplacement du corépresseur par un coactivateur, l'induction d'histone acétyltransférases et la transcription des gènes cibles, ceux dont le promoteur contient un VDRE.

Plusieurs observations ont permis de lier le VDR au contrôle de la prolifération cellulaire :

- parmi les gènes cibles du calcitriol figurent des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, qui codent pour : p21^{CIP1} (CDKN1A) et GADD45 (*Growth arrest and DNA damage inducible transcript*) ;
- expérimentalement, le calcitriol a un effet antiprolifératif *in vitro* qui a été également observé dans des études *in vivo* ;
- le knock-out du gène VDR chez la souris s'accompagne d'une majoration de la sensibilité aux agents cancérogènes ;
- dans les tumeurs humaines, on observe régulièrement une surexpression des enzymes de catabolisme de la vitamine D (CYP24A1) et une diminution de l'expression des enzymes de biosynthèse (CYP27A1, CYP27B1) ;
- des mutations ou réarrangements du VDR n'ont pas été décrits dans les tumeurs humaines, mais une surexpression du gène *NCOR2* a été observée dans les cancers du sein, de la prostate et du côlon ;
- sur le plan épidémiologique, il existe un lien entre la déficience en vitamine D ou le manque d'ensoleillement et le risque de cancer ;
- il existe des polymorphismes du VDR qui s'accompagnent d'une diminution ou d'une perte de l'activité du récepteur et d'une augmentation du risque de cancer.

La voie initiée par la vitamine D apparaît ainsi comme jouant un rôle anti-oncogénique et l'association de vitamine D et d'inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC, Annexe B) a été proposée pour le traitement des cancers épidermoïdes ou des syndromes myélodysplasiques. Cette approche thérapeutique est difficile, car les doses pharmacologiques de vitamine D ont des effets délétères en raison de l'hypercalcémie qu'elles entraînent. Toutefois, comme ces effets semblent dépendre des effets membranaires de la vitamine D, indépendants de sa liaison avec son récepteur, il apparaît possible de rechercher des analogues de la vitamine D capables de se fixer efficacement sur son récepteur nucléaire sans présenter les effets toxiques liés à l'augmentation de l'absorption intestinale du calcium. Des modulateurs non stéroïdiens de l'interaction du calcitriol avec son récepteur sont également à l'étude, en association avec des agents cytotoxiques.

Récepteurs de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA, *All-trans retinoic acid*) et, à un moindre degré, l'acide 9-*cis*-rétinoïque (9-*cis*-RA), sont les principales formes actives de la vitamine A. Ils jouent un rôle majeur dans la croissance et la différenciation de nombreux tissus. Il existe deux types de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque : les récepteurs de type RAR (RAR α , β et γ , ou NR1B1, 2 et 3) et les récepteurs de type RXR (RXR α , β et γ , ou NR2B1, 2 et 3). Les premiers sont des récepteurs à haute affinité pour ATRA et 9-*cis*-RA, alors que les seconds sont des récepteurs « adoptés », ne fixant que le 9-*cis*-RA, et avec une affinité plus faible. Ces récepteurs s'assemblent en hétérodimères RAR-RXR ou en homodimères RXR-RXR, les premiers au niveau de séquences dites RARE (*Retinoic acid responsive elements*), les seconds au niveau de séquences RXRE (*Retinoic X responsive elements*). En absence du ligand, les récepteurs répriment la transcription grâce à l'intervention des NCOR qui maintiennent les

histones sous forme désacétylée, ce qui empêche l'accessibilité des sites d'initiation de la transcription. En présence du ligand, les corépresseurs sont remplacés par des coactivateurs qui recrutent les histones acétyltransférases capables de remodeler la chromatine et de permettre le démarrage de la transcription.

L'acide rétinoïque exerce, sur les cellules normales et tumorales, un effet antiprolifératif caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire en G1 et une induction de la différenciation. L'expression du RAR β , au niveau de l'ARN messager et de la protéine, est diminuée dans de nombreux cancers. La restauration de cette expression permet de sensibiliser les cellules tumorales à l'ATRA et d'inhiber la croissance tumorale. Il en est de même pour les récepteurs RAR α et RAR γ dans certains cancers. En dehors du cas précis de la leucémie aiguë promyélocytaire (paragraphe suivant), il n'a pas été possible jusqu'ici de comprendre le mécanisme de cette diminution d'expression des RAR dans les cancers. Une méthylation du promoteur du RAR β et une perte d'hétérozygotie au niveau du locus 3p24 ont été invoquées sans preuve décisive de leur intervention.

Le rôle du récepteur RAR α dans la leucémie aiguë promyélocytaire (APL) est en revanche bien établi. Il a suivi la découverte de l'effet thérapeutique de l'ATRA dans cette forme de leucémie, qui représente le premier succès des thérapies ciblées sur un mécanisme oncogénique précis. La pathogénie de l'APL résulte de la translocation du gène RARA à divers endroits du génome, conduisant à la synthèse de protéines de fusion X-RAR ou RAR-X. Les diverses protéines de fusion avec le produit d'un gène nommé *PML* (*Promyelocytic leukemia*) sont les plus fréquemment observées. Dans tous les cas, la protéine de fusion exerce un effet dominant négatif sur la fonction normale du RAR, empêchant le départ des corépresseurs, donc la transcription des gènes cibles de l'acide rétinoïque. L'administration d'ATRA à doses pharmacologiques permet de dépasser ce blocage et de permettre le fonctionnement de cette voie de signalisation. Il s'ensuit une différenciation des cellules promyélocytaires bloquées dans leur programmation normale. Peu de choses sont en revanche connues en ce qui concerne les gènes cibles dont l'expression est nécessaire au développement de ces cellules. La progression de la maladie accompagne l'apparition d'une résistance à l'ATRA ; cette résistance est liée à des mutations supplémentaires de la protéine de fusion au niveau de ses domaines de liaison avec l'ATRA.

Récepteurs PPAR

Les peroxysomes sont des organelles intracytoplasmiques chargées de la détoxification de l'oxygène moléculaire et de ses formes radicalaires toxiques (voir chapitre 16). Ils sont également impliqués dans la β -oxydation des acides gras, la biosynthèse et la dégradation du cholestérol et la synthèse des glycérolipides. Un ensemble de molécules endogènes et exogènes exercent un effet sur la prolifération des peroxysomes ; ce sont essentiellement des lipides : acides gras, en particulier polyinsaturés, prostaglandines et leucotriènes qui en dérivent *via* l'action des lipo-oxygénases et des cyclo-oxygénases, ainsi que quelques médicaments, surtout de la classe des fibrates, inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol. Les récepteurs PPAR α , β/δ et γ , ou

NR1C1, 2 et 3, au départ récepteurs « orphelins », sont activés par ces molécules qu'ils sont capables de fixer avec une faible affinité, ce qui en a fait des récepteurs « adoptés ».

Les PPAR sont associés au niveau de leur cible avec le récepteur RXR pour former des hétérodimères. Comme les autres récepteurs nucléaires, ils exercent en absence de ligand une répression de la transcription au niveau de PPRE (*Peroxisome-proliferator responsive element*) par l'intermédiaire de NCOR, qui est levée après fixation du ligand par l'intervention de NCOA. C'est en dernier ressort par acétylation-désacétylation de la chromatine qu'est régulée l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Les PPRE sont trouvés dans les promoteurs de gènes impliqués dans le transport des acides gras, le métabolisme lipidique, ainsi que dans des gènes impliqués dans des fonctions de prolifération (PDK1, *Phosphoinositide-dependent kinase*, chapitre 3) et d'adhésion (ILK, *Integrin-linked kinase*, chapitre 11). La distribution tissulaire, la nature des ligands et le rôle physiologique des PPAR sont distincts, mais nous ne les détaillerons pas ici.

Le plus étudié des PPAR est le PPAR γ ; son implication dans l'oncogénèse est débattue : il apparaît comme anti-oncogénique dans la plupart des modèles, mais pro-oncogénique dans certains cas. Les thiazolidine-diones, agonistes du PPAR γ et utilisés dans le traitement du diabète de type II, ont un effet préventif sur l'apparition des tumeurs murines ; des mutations du PPAR γ ont été observées dans les cancers colorectaux et des translocations, aboutissant à des protéines de fusion à fonction dominante négative, dans les cancers thyroïdiens, ainsi que des délétions homozygotes dans les cancers de la prostate. Des essais thérapeutiques prometteurs d'agonistes du PPAR γ ont été mis en place dans les liposarcomes. En revanche, il existe avec les thiazolidine-diones une stimulation du développement tumoral dans les modèles d'adénome colique ayant une invalidation du gène APC (chapitre 7), ce qui doit conduire à une surveillance coloscopique des patients diabétiques traités par ces molécules.

De façon indirecte, la cyclo-oxygénase (COX2), qui produit des agonistes puissants du PPAR γ , est impliquée dans le rôle pro- ou anti-oncogénique de ces récepteurs nucléaires. L'association d'inhibiteurs de COX2 et d'agonistes de PPAR γ pourrait avoir un effet synergique exploitable en oncologie.

Le rôle du PPAR β/δ dans l'oncogénèse est encore moins clair que celui du PPAR γ ; son activation peut avoir des conséquences pro-oncogéniques (résistance à l'apoptose, augmentation des propriétés migratrices) et anti-oncogéniques (diminution de la prolifération) selon le contexte tissulaire ou cellulaire. Quant au PPAR α , il apparaît plutôt pro-oncogénique ; ses agonistes pharmacologiques sont les fibrates, qui induisent *in vitro* et *in vivo* une stimulation de la prolifération hépatocytaire et une inhibition de l'apoptose. Ils ont un effet hépatocancérogène à long terme chez les rongeurs, mais cela n'a jamais été observé chez l'homme.

Récepteurs des xénobiotiques

Les récepteurs PXR (NR1I2) et CAR (NR1I3) ont été considérés au départ comme des récepteurs orphelins, car ils ne reconnaissent pas de composé endogène avec une haute affinité. Ils reconnaissent en fait une grande variété de ligands et jouent un rôle majeur contre les effets néfastes de l'accumulation des composés toxiques endogènes et exogènes. Ils sont principalement exprimés dans le foie, le rein et l'intestin. Les récepteurs PXR et CAR ont pour cibles des gènes codant pour des protéines de métabolisme des médicaments, comme ces cytochromes ; ils jouent un rôle majeur dans la détoxification des xénobiotiques et de produits endogènes toxiques (bilirubine, acides biliaires). En oncologie, ces xénorécepteurs ont un rôle important en ce qui concerne la modulation du risque de cancer d'une part, et en ce qui concerne la modulation de l'activité des agents anticancéreux d'autre part.

Comme les autres récepteurs de la famille NR1, ils s'hétérodimérisent avec un récepteur RXR, se fixent en absence de ligand sur leurs *responsive elements* et répriment la transcription des gènes cibles ; en présence de ligand, l'inhibition est levée et la transcription peut avoir lieu. Parmi les gènes cibles les mieux caractérisés figurent celui codant le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), qui assure le métabolisme oxydatif de très nombreux médicaments, l'UDP-glucuronosyltransférase 1A1 (UGT1A1) qui conjugue à l'acide glucuronique des composés endogènes et des médicaments et la glycoprotéine P (MDR1 [*Multidrug resistance 1*], ou ABCB1), un transporteur impliqué dans l'élimination de nombreux xénobiotiques hors de l'organisme. Les agonistes des xénorécepteurs ne sont pas toujours identifiés avec précision ; ils avaient été identifiés originalement comme des inducteurs des cytochromes et des transporteurs ABC : rifampicine, phénobarbital, hyperforine, etc. Ces composés se révèlent de puissants inhibiteurs de l'action des médicaments administrés par voie orale en raison de ce phénomène d'induction.

Bibliographie

- Ali S, Coombes RC. (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer*; 2: 101-12.
- Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM *et al.* (2007) RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov*; 6: 793-810.
- Aranda A, Martínez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L *et al.* (2009) Thyroid receptor: roles in cancer. *Trends Endocrinol Metab*; 20: 318-24.
- Aranda A, Pascual A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*; 81: 1269-304.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. (1999) Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*; 23: 255-75.
- Conzen SD. (2008) Nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol*; 22: 2215-28.
- Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*; 7: 684-700.

- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. (2003) Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*; 65: 261-311.
- Frankfurt O, Rosen ST. (2004) Mechanisms of glucocorticoid-induced apoptosis in hematologic malignancies: updates. *Curr Opin Oncol*; 16: 553-63.
- González-Sancho JM, García V, Bonilla F, Muñoz A. (2003) Thyroid hormone receptors/THR genes in human cancer. *Cancer Lett*; 192: 121-32.
- Gronemeyer H, Gustafsson JA, Laudet V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov*; 3: 950-64.
- Handschin C, Meyer UA. (2003) Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*; 55: 649-73.
- Hu X, Lazar MA. (2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*; 11: 6-10.
- Lee JS, Kim KI, Baek SH. (2008) Nuclear receptors and coregulators in inflammation and cancer. *Cancer Lett*; 267: 189-96.
- Michalik L, Desvergne B, Wahli W. (2004) Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*; 4: 61-70.
- O'Malley BW, Kumar R. (2009) Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res*; 69: 8217-22.
- Privalsky ML. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*; 66: 315-60.
- Rosenfeld MG, Glass CK. (2001) Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem*; 276: 36865-8.
- Soprano DR, Qin P, Soprano KJ. (2004) Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr*; 24: 201-21.
- Tenbaum S, Baniahmad A. (1997) Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int J Biochem Cell Biol*; 29: 1325-41.
- Thorne J, Campbell MJ. (2008) The vitamin D receptor in cancer. *Proc Nutr Soc*; 67: 115-27.
- Wang T, Xu J, Yu X *et al.* (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*; 58: 1-14.

Chapitre 15

Récepteurs couplés à des canaux ioniques

Introduction

La conduction de l'influx nerveux, qui est une voie majeure de signalisation des organismes pluricellulaires, fait appel à des canaux ioniques disposés au niveau de la membrane plasmique des cellules excitables. L'ouverture et la fermeture de ces canaux sont commandées par le degré de polarisation des membranes et ils sont dits pour cela dépendant du voltage (*Voltage-operated channels*, VOC). Au niveau des synapses, la transmission de l'influx nerveux d'un neurone à un autre ou à une cellule musculaire se fait grâce à la libération, dans la fente synaptique, de transmetteurs qui activent l'ouverture de nouveaux canaux ioniques. Ces derniers sont appelés *Receptor-operated channels* (ROC), récepteurs ionotropes ou *Ligand-gated ion channels* (LGIC). Leurs ligands sont les neurotransmetteurs, acétylcholine, sérotonine, acides aminés, nucléotides puriques (ATP). Ils peuvent en outre réagir avec des protéines intracellulaires (petites protéines G, tyrosine kinases cytoplasmiques) et avec des protéines du cytosquelette ; en dehors du tissu nerveux, ils peuvent se comporter comme des molécules de signalisation classiques dans de nombreux types cellulaires.

Au niveau intracellulaire existent également des canaux ioniques activés par des récepteurs, qui permettent en particulier le passage de l'ion calcium Ca^{2+} d'un compartiment dans un autre. La signalisation calcique a été évoquée dans le chapitre 6 : le second messager de l'activation des GPCR (*G protein coupled receptors*) aboutit en effet à la libération de Ca^{2+} dans le cytosol, ce qui lui permet d'activer ses effecteurs nombreux, dont le rôle est particulièrement important dans la contraction musculaire et dans les phénomènes de sécrétion.

Nous ne pourrions ici développer tous les aspects de la signalisation mise en jeu par les flux ioniques, qui relève des neurosciences plus que de l'oncologie ; après une présentation volontairement simpliste de l'activation des LGIC dans les cellules excitables, nous présenterons deux types particuliers de récepteurs-canaux : les récepteurs purinergiques et les récepteurs permettant la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire.

L'activation des récepteurs couplés à des canaux ioniques

Les récepteurs ionotropes ou LGIC sont des canaux ioniques permettant le passage, à travers la membrane plasmique des cellules excitables, d'anions (Cl^-) et de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Ils se distinguent des canaux activés par la dépolarisation membranaire (*Voltage-gated ion channels*) situés en amont et en aval de leur activation. Ce sont le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, le récepteur de la sérotonine, certains récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), du glutamate et de la glycine, ainsi que des récepteurs de l'ATP, appelés récepteurs purinergiques ou récepteurs P2X. Pour la plupart de ces ligands, il existe d'autres récepteurs appartenant à la famille des GPCR (chapitre 6), que l'on appelle métabotropes pour les distinguer des ionotropes : le récepteur muscarinique de l'acétylcholine, des récepteurs des acides aminés, et un autre type de récepteurs purinergiques, les récepteurs P2Y, qui reconnaissent également les nucléotides adényliques, ainsi que des récepteurs P1 ou ADOR qui reconnaissent l'adénosine.

Les LGIC ont une structure globale analogue, faite de protéines transmembranaires regroupées pour former un pore par lequel passeront les ions, cations ou anions selon les cas. Ils sont constitués de sous-unités protéiques multiples (il en existe soixante-dix au total) dont l'assemblage aboutit à des unités fonctionnelles précises localisées tout particulièrement au niveau des synapses. Certains ont une structure pentamérique (récepteurs de l'acétylcholine, de la sérotonine, du GABA, de la glycine), d'autres une structure tétramérique (récepteurs du glutamate), d'autres enfin une structure trimérique (récepteurs purinergiques). La variété de l'assemblage des sous-unités constitutives de chaque type de récepteur (fig. 15-1) permet la spécificité de la reconnaissance et de la fixation du ligand, de la nature de l'ion transporté, de la conductance du canal, de la vitesse d'ouverture et de fermeture du canal, etc.

Les récepteurs de l'acétylcholine et de la sérotonine sont des canaux permettant le passage des ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} ; ils entraînent une dépolarisation de la membrane et ont un effet positif sur l'ouverture des canaux ioniques voltage-dépendants qui transmettent l'influx nerveux : ils sont présents au niveau des synapses excitatrices. Les récepteurs de la glycine et du GABA, en revanche, sont des canaux Cl^- qui entraînent lors de leur ouverture une hyperpolarisation membranaire : ils ont un effet négatif sur la transmission de l'influx nerveux et sont présents au niveau de synapses inhibitrices. Enfin, les récepteurs ionotropes du glutamate sont des canaux calciques impliqués dans des modalités particulières de la transmission synaptique que nous ne pouvons envisager ici.

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine a été l'un des premiers récepteurs connus, tant au niveau physiologique qu'au niveau moléculaire, et a marqué l'histoire de la signalisation cellulaire et celle de la transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire. Il est constitué de cinq sous-unités associées : deux de type α , et une de chaque autre type (β , γ et δ). Il existe neuf gènes différents codant pour les sous-unités α , quatre pour les sous-unités β et un pour les sous-unités γ ou δ . Chaque sous-unité est une protéine pourvue de quatre hélices transmembranaires (M1 à M4) et de domaines N-terminal et C-terminal extracellulaires. Les hélices M2

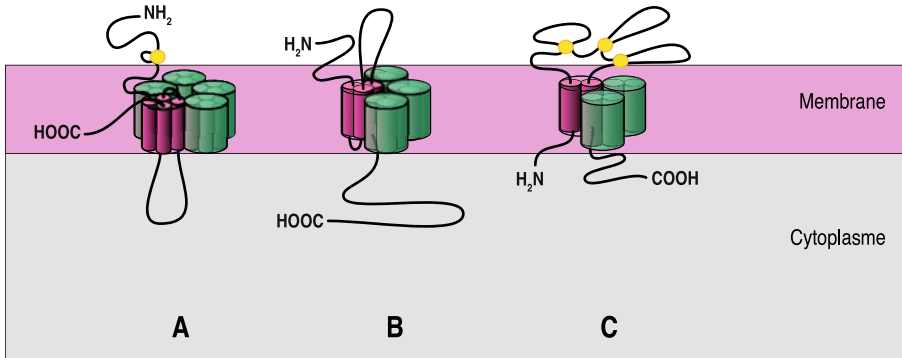


Fig. 15-1 – Organisation générale des récepteurs couplés à un canal ionique.

Les récepteurs couplés aux canaux ioniques de la membrane plasmique (LGIC) sont de plusieurs types : Selon les cas, les extrémités N- et C-terminales sont extracellulaires ou cytoplasmiques. Les disques jaunes indiquent la présence de ponts disulfure.

A. Récepteurs pentamériques, chaque monomère étant constitué de quatre hélices transmembranaires : récepteur nicotinique de l'acétylcholine, récepteurs de la sérotonine, du GABA, de la glycine ;

B. Récepteurs tétramériques, chaque monomère étant constitué de trois hélices transmembranaires : récepteurs du glutamate ;

C. Récepteurs trimériques, chaque monomère étant constitué de deux hélices transmembranaires : récepteurs purinergiques.

interagissent pour délimiter le pore par où passera le cation et les domaines N-terminaux pour former le site de fixation de l'acétylcholine. Les récepteurs ionotropes de la sérotonine, de la glycine et du GABA sont bâtis selon le même schéma général.

Les récepteurs purinergiques

Les récepteurs P2X, au nombre de sept, nommés de P2X1 à P2X7, sont formés de trois sous-unités, identiques ou différentes, chacune faite de deux domaines transmembranaires séparés par une boucle extracellulaire de grande taille contenant systématiquement dix résidus cystéine reliés par des ponts disulfure, et de domaines N- et C-terminaux localisés à l'intérieur de la cellule. L'activation de ces récepteurs par leur ligand entraîne l'entrée d'ions sodium ou calcium et la sortie d'ions potassium, dans le sens de leur gradient de concentration et sans sélectivité marquée. Il en résulte une dépolarisation membranaire susceptible d'activer les canaux voltage-dépendants et de générer un potentiel d'action. Les récepteurs purinergiques sont localisés dans les cellules excitables (neurones et cellules musculaires lisses), mais aussi dans des cellules épithéliales (poumon, intestin, etc.) et endothéliales.

Il avait été observé de longue date que l'ATP pouvait présenter une activité antiproliférative. On peut faire l'hypothèse que cette activité découle de l'activation de récepteurs purinergiques (GPCR ou LGIC), mais éventuellement par la formation d'adénosine par les ecto-ATPases membranaires, l'adénosine pouvant se fixer sur des

récepteurs de type GPCR distincts, ou encore par un effet nutritionnel de l'ATP. Des récepteurs de type P2X et P2Y sont exprimés dans de nombreux types de cancers, en particulier le P2X5 et le P2X7 qui paraissent être les plus fréquemment rencontrés. Le traitement de cellules en culture exprimant ces récepteurs par l'ATP entraîne une apoptose détectée par l'activation de la caspase 3 (chapitre 18), mais dont les mécanismes de mise en œuvre n'ont pas été décrits. En revanche, les récepteurs de type P2Y ont un effet positif sur la signalisation cellulaire, assuré, comme toujours pour des GPCR, par les seconds messagers que sont l'AMP cyclique, l'inositol triphosphate IP3 et l'ion calcium Ca^{2+} (chapitre 6).

Des essais cliniques explorant la faisabilité d'injections d'ATP sous forme de perfusion ont été réalisés, mais n'ont pas permis de conclure, au-delà de cette étape, si ces administrations pouvaient se révéler efficaces en oncologie. Des outils thérapeutiques plus sélectifs et plus stables que l'ATP lui-même pourraient toutefois se révéler intéressants.

La signalisation calcique

L'intérêt particulier du Ca^{2+} dans la transduction des signaux vient de la différence considérable qui existe entre sa concentration extracellulaire (de l'ordre du mM) et sa concentration cytosolique (de l'ordre de 100 nM). L'existence de réserves importantes de Ca^{2+} dans des organelles comme le réticulum endoplasmique permet de générer des signaux intracellulaires permettant la mise en œuvre de réactions rapides et fugaces. Quatre étapes successives mettent en jeu la signalisation calcique :

- des stimulus divers génèrent des signaux de mobilisation du Ca^{2+} ;
- ces signaux activent des canaux qui apportent une quantité critique de Ca^{2+} dans le cytosol ;
- le Ca^{2+} active une série d'effecteurs cytoplasmiques qui sont sensibles à sa présence ;
- des pompes chassent le Ca^{2+} hors du cytosol pour revenir à l'état initial.

Ce schéma général est décliné dans les cellules de multiples façons en fonction de leur équipement en protéines à chacun des niveaux mentionnés.

Signaux de mobilisation du Ca^{2+}

Plusieurs types de signaux sont capables d'induire une mobilisation du Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire ou des réserves du réticulum endoplasmique (fig. 15-2). Ces signaux entraînent l'ouverture de canaux permettant d'augmenter d'un facteur 5 à 10 (de 100 à 500-1000 nM) la concentration cytosolique en Ca^{2+} .

Au niveau intracellulaire, ces signaux sont l'inositol triphosphate (IP3, voir chapitre 6), qui agit sur des récepteurs spécifiques (IP3R ou ITPR), et l'ADP-ribose cyclique (cADPR), l'activateur physiologique du récepteur de la ryanodine (RyR) (fig. 15-3). D'autres signaux, comme la sphingosine-1-phosphate (S1P) et l'acide nicotinique dinucléotide phosphate (NAADP), agissent sur des récepteurs encore mal caractérisés. Dans tous les cas, le Ca^{2+} lui-même est un inducteur de son propre relar-

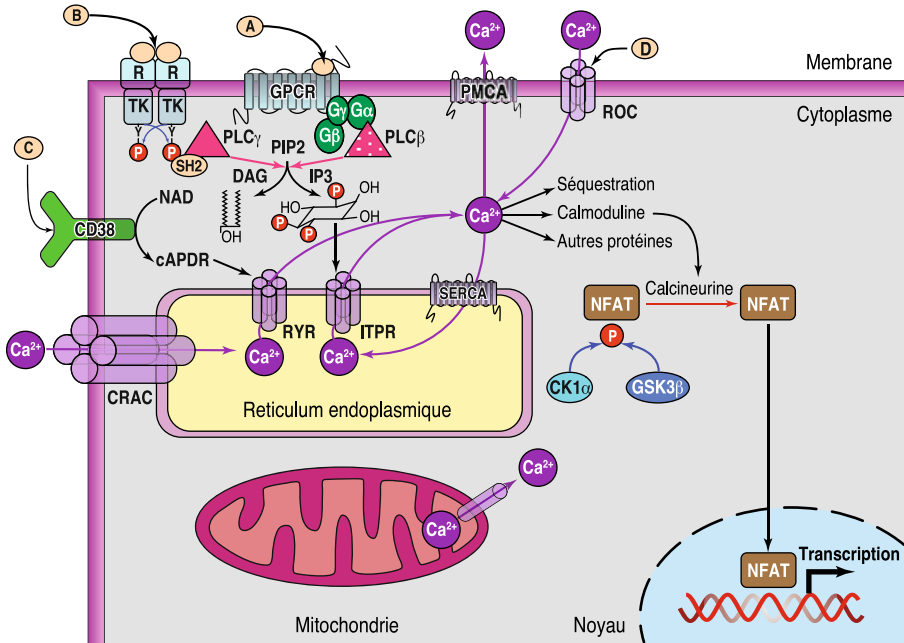


Fig. 15-2 – Signalisation calcique.

Le Ca^{2+} cytosolique (100 nM) peut provenir du milieu extracellulaire (1,3 mM) *via* des canaux activés par des récepteurs (LGIC ou ROC) ou du réticulum endoplasmique *via* des canaux activés par l'IP3 (ITPR) ou le cADPR (RYR). Il est réexporté par des pompes ATPasiques de la membrane plasmique (PMCA) ou du réticulum endoplasmique (SERCA). L'IP3 est produit en particulier après activation d'un GPCR ou d'un RTK grâce au clivage d'un lipide à inositol par une PLC β ou d'une PLC γ . Le cADPR est produit à partir du NAD par un récepteur comme CD38. Les réserves calciques du réticulum endoplasmique peuvent être reconstituées à partir du milieu extracellulaire par un canal direct appelé CRAC. Ainsi, les signaux pouvant moduler la concentration cytosolique du Ca^{2+} peuvent être les ligands de GPCR (A) ou de RTK (B), des ligands de CD38 (C), des ligands des LGIC (D), l'activation du CRAC étant réalisée par la déplétion des réserves du réticulum endoplasmique. Parmi ses multiples actions, le Ca^{2+} active, *via* la calmoduline, une phosphatase appelée calcineurine qui active le facteur de transcription NFAT.

gation dans le cytosol grâce à un rétrocontrôle positif appelé CICR (*Ca²⁺-induced Ca²⁺ release*). La véritable action des messagers que sont l'IP3 et le cADPR est d'augmenter la sensibilité des récepteurs à l'action du Ca^{2+} . Les mêmes cellules peuvent contenir plusieurs types de récepteurs et répondre ainsi de la même façon à des stimuli différents.

La génération de l'IP3 se fait essentiellement à partir de l'activation des GPCR par leurs nombreux ligands (chapitre 6). Rappelons simplement que ce second messager de l'action des ligands des GPCR est produit par hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate par une phospholipase C bêta (PLC β) après son activation par une protéine G hétérotrimérique. L'IP3 peut également être produit par une PLC γ activée

par les récepteurs à activité tyrosine kinase (chapitre 1), par une PLC ϵ activée par des protéines G comme RAS (chapitre 2) et RHO ou par une PLC δ activée elle-même par les variations de concentration en Ca²⁺ cytosolique.

La génération du cADPR et du NAADP est réalisée à partir du NAD par des récepteurs membranaires appelés CD38 et CD157, possédant une activité d'ADP-ribosyl cyclase et de cADP-ribose hydrolase. Le CD38 est présent entre autres dans les tissus lymphoïdes, en particulier dans les cellules de leucémie lymphoïde chronique (LLC). Les messagers activateurs des activités enzymatiques du CD38 ne sont pas connus avec précision. L'activation du CD38 semble se produire après interaction avec les récepteurs membranaires présents dans les différents lignages de cellules lymphoïdes, en particulier les *B-cell-* et *T-cell receptors* (chapitre 13). Le ciblage du CD38 pourrait se révéler intéressant dans le traitement de la LLC.

Au niveau de la membrane plasmique, le calcium est mobilisé par activation de canaux voltage-dépendants (VOC, *Voltage-operated channels*) ainsi que par des récepteurs ionotropes (ROC, *Receptor-operated channels*) activés par le glutamate et d'autres ligands mentionnés p. 178, par des canaux activés de façon lente et destinés à reconstituer les stocks calciques du réticulum endoplasmique, les SOC (*Store-operated channels*). Les canaux voltage-dépendants, de cinq types différents (L, N, P/Q, R, T), sont activés par la dépolarisation membranaire induite, dans les cellules excitables, par l'arrivée d'un influx nerveux. Leur activité est modulée principalement par phosphorylation pour les canaux de type L et par interaction avec des petites protéines G pour les autres. Les récepteurs ionotropes des cellules nerveuses sont situés au niveau post-synaptique et transmettent des messages excitateurs. Enfin, les SOC sont localisés dans de nombreux types cellulaires, entre autres les lymphocytes T et les cellules spécialisées dans la sécrétion hormonale (pancréas, hypophyse, etc.). Ils sont constitués d'un canal calcique de la membrane plasmique, CRAC (*Calcium release-activated calcium modulator*), couplé topologiquement et fonctionnellement à un « senseur » du réticulum endoplasmique, STIM (*Stromal interaction molecule*) pour que le Ca²⁺ puisse passer directement du milieu extracellulaire au réticulum endoplasmique et reconstituer ses stocks intracellulaires.

Ouverture des canaux calciques

L'entrée du Ca²⁺ dans le cytosol à partir du réticulum endoplasmique est réalisée grâce à l'ouverture de canaux membranaires sélectifs du Ca²⁺ (fig. 15-2). Les canaux intracellulaires permettant la sortie du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique sont en fait les récepteurs ITPR et RYR eux-mêmes ; au niveau de la membrane plasmique, ce sont les VOC, les ROC et les SOC du paragraphe précédent qui permettent le passage sélectif du Ca²⁺.

Les ITPR, évoqués chapitre 6, sont de véritables récepteurs ionotropes (*Ligand-gated ion channels*) intracellulaires. Il en existe trois isoformes qui sont assemblés en homo- ou hétérotétramères formant un pore de poids moléculaire avoisinant 1,2 MDa. Il existe une grande diversité des combinaisons possibles des isoformes dont le rôle reste à déchiffrer. Chaque monomère possède six hélices transmembranaires et

un grand nombre de domaines d'interaction avec d'autres protéines et de sites de modifications post-traductionnelles (fig. 15-3). Les extrémités N- et C-terminales de chaque monomère sont localisées dans le cytosol et le site de fixation de l'IP3 est situé du côté N-terminal. L'ouverture du canal est principalement régulée par ses trois ligands que sont le Ca^{2+} lui-même, l'IP3 et l'ATP, qui exerce une régulation allostérique variable selon le tétramère considéré. La phosphorylation des ITPR par la protéine kinase C, la kinase AKT (chapitre 3) et les tyrosine kinases cytoplasmiques constitue un ensemble de régulations importantes de leur activité.

Les récepteurs de la ryanodine ont été d'abord identifiés en raison de l'activité de cet alcaloïde en tant qu'agoniste de ces récepteurs. Leur ligand physiologique, mis à part le Ca^{2+} lui-même, est le cADPR (fig. 15-3). Il existe également trois isoformes qui s'assemblent en homotétramères de poids moléculaire supérieur à 2 MDa pour former le pore permettant le passage du Ca^{2+} . Chaque monomère possède un domaine C-terminal contenant six hélices transmembranaires formant le pore, et un très vaste domaine N-terminal porteur de nombreux sites de régulation. Comme pour les ITPR, c'est en fait le Ca^{2+} lui-même qui est l'agoniste principal de ces récepteurs dans le cadre du CICR.

La sortie du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique peut prendre plusieurs aspects : il s'agit parfois de simples émissions à partir d'un récepteur-canal qui portent le nom de *blips* pour les ITPR et ou de *quarks* pour les RYR. L'agrégation de récepteurs-

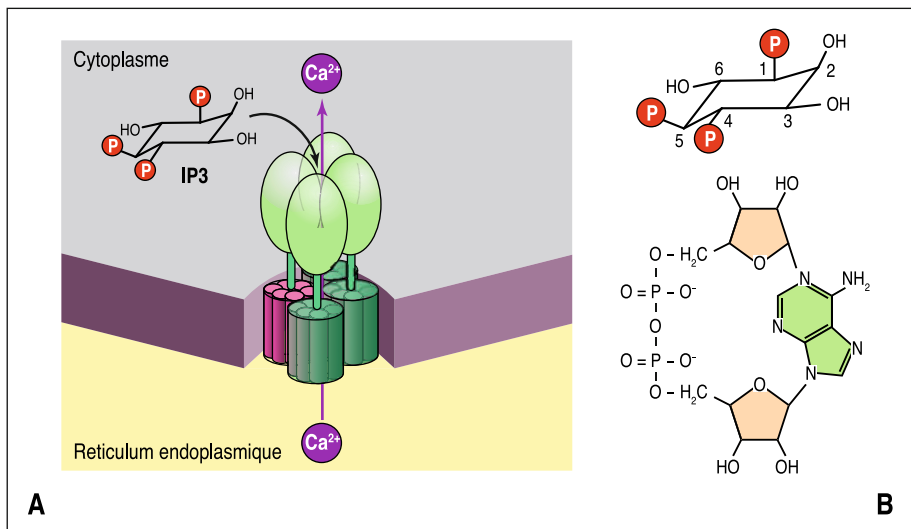


Fig. 15-3 – Les canaux calciques intracellulaires et leurs ligands.

A. Structure générale du récepteur de l'IP3 (ITPR). Ce récepteur est constitué de quatre sous-unités, faites de six hélices transmembranaires, l'ensemble délimitant un pore permettant le passage du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme. De volumineux domaines N-terminaux, du côté cytoplasmique, contiennent en particulier le site de reconnaissance de l'IP3. Le récepteur de la ryanodine est construit de façon similaire.

B. Structure de l'IP3 et de l'ADP-ribose cyclique (cADPR).

canaux permet leur activation concertée et l'émission de *puffs* (ITPR) ou de *sparks* (RYS). Enfin, le passage auto-entretenu de grandes quantités de Ca^{2+} dans le cytosol permet la propagation de vagues calciques (*waves*) embrasant rapidement et transitoirement l'ensemble de la cellule et pouvant atteindre les cellules voisines par l'intermédiaire des jonctions intercellulaires. C'est l'activation des différents GPCR par leurs ligands, à l'origine de l'IP3, qui conditionne le type de réponse calcique des effecteurs.

Activités intracellulaires dépendantes du Ca^{2+}

Le Ca^{2+} entrant dans le cytosol est immédiatement fixé sur des protéines qui le piègent et jouent un rôle tampon, comme la parvalbumine, la calséquestrine et la calréticuline ; une petite fraction reste à l'état libre, disponible pour activer des protéines spécifiques sensibles aux variations de sa concentration (*Ca^{2+} sensors*). Deux types de domaines protéiques sont capables de fixer le Ca^{2+} : les motifs « à main EF » et les motifs C2. La principale protéine sensible au Ca^{2+} est la calmoduline (CAM), dont l'activation par le Ca^{2+} entraîne un changement de conformation qui permet en aval le contrôle de nombreux processus : contraction du muscle lisse, interaction entre voies de signalisation, transcription, modulation des canaux ioniques. Son isoforme musculaire, la troponine C (TNNC), contrôle essentiellement l'interaction entre actine et myosine durant la contraction musculaire (cœur et muscles squelettiques).

La calmoduline possède quatre sites de fixation du Ca^{2+} , au niveau de motifs EF. Une fois qu'elle a fixé le Ca^{2+} , elle se lie et active diverses protéines parmi lesquelles :

- des kinases comme la glycogène phosphorylase kinase et la glycogène synthase kinase, ce qui renforce l'action de la PKA pour la mobilisation du glycogène (chapitre 6) ;
- des enzymes comme l'adénylcyclase et la phosphodiesterase (chapitre 6), ce qui génère un bref *pulse* d'AMP cyclique ;
- des phosphatases comme la calcineurine (CALN), qui permet l'activation du facteur de transcription NFAT (voir p. 185) ;
- la *nitric oxide synthase* (NOS) (chapitre 16).

Il existe des protéines autres que la calmoduline qui sont capables de répondre directement aux changements de concentration du Ca^{2+} ; elles possèdent pour cela des domaines EF ou C2. On peut citer :

- la calpaïne (CAPN), qui est une cystéine protéase impliquée, par exemple, dans l'activation de l'IL1 α (chapitre 12) ;
- la synaptotagmine (SYT) et d'autres protéines impliquées, au niveau présynaptique, dans la libération des neurotransmetteurs à partir des vésicules de stockage ;
- la diacylglycérol kinase (DAGK), qui phosphoryle le second messenger formé à partir du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate par l'action des phospholipases C β (chapitre 6) ou γ (chapitre 1) ; cette enzyme permet de démarrer la resynthèse des lipides à inositol ;
- des protéines du cytosquelette, comme l' α -actinine et la gelsoline.

Sans épuiser le sujet, on peut dire que le Ca^{2+} a des actions sur la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la motilité, la transmission synaptique, la contraction musculaire, le métabolisme glucidique, la sécrétion, l'apoptose, le chimiotactisme, et de nombreuses voies de signalisation.

Retour à l'état initial

Le Ca^{2+} cytosolique est rapidement chassé du cytoplasme et renvoyé vers l'extérieur de la cellule ou vers ses sites de stockage une fois le signal calcique émis. Il existe une pompe ATPasique au niveau de la membrane plasmique, la Ca^{2+} -ATPase ou PMCA (*Plasma membrane calcium ATPase*), capable de chasser le Ca^{2+} hors de la cellule contre un gradient de concentration important (fig. 15-2). Au niveau du réticulum, il existe une pompe analogue appelée SERCA (*Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*) et des échangeurs Na^+ - Ca^{2+} appelés NCX, pour le renvoyer vers le réticulum endoplasmique. Les mitochondries participent activement à ce processus en séquestrant le Ca^{2+} lorsqu'elles sont localisées à proximité des récepteurs-canaux RYR et ITPR, grâce à un transporteur spécialisé de faible affinité.

NFAT, un facteur de transcription activé par l'entrée du Ca^{2+}

NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) est un facteur de transcription d'abord décrit dans les lymphocytes T (chapitre 13), mais qui a été ensuite retrouvé dans de nombreux types cellulaires. Il est initialement présent dans le cytoplasme à l'état phosphorylé ; c'est la calcineurine, activée par la libération intracytoplasmique de Ca^{2+} , en particulier en provenance du milieu extracellulaire grâce au récepteur-canal CRAC, qui enlève ce groupement phosphate ; il en résulte la migration de NFAT dans le noyau où il peut exercer son activité de contrôle transcriptionnel au niveau de ses gènes cibles.

Il existe en fait cinq facteurs homologues, ayant une parenté structurale avec les facteurs REL (*Reticulo-endotheliosis viral oncogene homolog*) du NF κ B étudiés chapitre 12, car possédant un domaine RHD. Ils possèdent un domaine de transactivation de la transcription appelé NHD (*NFAT homology domain*). Les facteurs NFAT se fixent sur l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Ils coopèrent avec d'autres facteurs de transcription comme AP1 (JUN-FOS, chapitre 2) et peuvent former des tétramères.

Les facteurs NFAT sont présents dans le cytoplasme à l'état phosphorylé. Il existe de nombreux sites de phosphorylation, certains regroupés en un site riche en sérines (SRR, *Serine-rich region*), d'autres plus dispersés. La phosphorylation cytoplasmique de NFAT est le fait de plusieurs sérine/thréonine kinases, en particulier la protéine kinase A (PKA), la caséine kinase 1 (CK1) et la glycogène synthase kinase 3 (GSK3 β). Comme nous l'avons vu ci-dessus, l'ouverture du canal calcique CRAC de la membrane plasmique est l'élément indispensable à l'activation de la phosphatase appelée calcineurine et à la relocalisation de NFAT dans le noyau une fois déphos-

phorylé, grâce au démasquage d'un signal de localisation nucléaire NLS. Une fois dans le noyau, des kinases nucléaires peuvent le rephosphoryler, et entraînent ainsi son retour vers le cytoplasme.

Les différents facteurs NFAT peuvent avoir des rôles différents, sinon opposés. NFAT1 s'oppose à la prolifération et induit la transcription de gènes d'apoptose, alors que NFAT2 a des effets opposés sur la prolifération et la survie cellulaires. Il en résulte que *NFAT1* est un gène suppresseur de tumeurs et *NFAT2* un proto-oncogène. Toutefois, NFAT1 induit également la transcription de gènes de migration et d'invasion, ce qui en fait un facteur proangiogénique et pro-métastatique. Une activation importante de NFAT2 est observée dans de nombreux cancers humains, en particulier, mais pas seulement, les lymphomes B et T et les leucémies, avec une localisation permanente de ce facteur dans le noyau. Les mécanismes expliquant la suractivation de cette voie de signalisation ne sont pas connus à l'heure actuelle.

Une cible potentielle de NFAT est l'action sur la calcineurine (et d'autres protéines activées par le Ca^{2+}) de composés comme la cyclosporine A et le FK506. Ces composés ont des propriétés immunosuppressives importantes, utilisées en particulier dans le traitement des rejets de greffe. Toutefois, induire une immunosuppression n'apparaît pas souhaitable dans le traitement des cancers, et des cibles plus sélectives doivent être recherchées. Des peptides mimant l'interaction entre calcineurine et NFAT ont été recherchés, ainsi que des petites molécules inhibant spécifiquement NFAT2, basées sur la structure de la cyclosporine A ou du FK506, mais dépourvues de leurs effets immunosuppresseurs.

Bibliographie

- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4: 517-29.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 1: 11-21.
- Berridge MJ. (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta*; 1793: 933-40.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. (2009) A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*; 56: 2-5.
- Deli T, Csernoch L. (2008) Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathol Oncol Res*; 14: 219-31.
- Fliegert R, Gasser A, Guse AH. (2007) Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem Soc Trans*; 35: 109-14.
- Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO. (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol Rev*; 87: 593-658.
- Hamilton SL. (2005) Ryanodine receptors. *Cell Calcium*; 38: 253-60.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. (2004) Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol*; 86: 161-204.
- Lee HC. (2001) Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 41: 317-45.

- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A *et al.* (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*; 88: 841-86.
- Mancini M, Toker A. (2009) NEAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer*; 9: 810-20.
- Prakriya M. (2009) The molecular physiology of CRAC channels. *Immunol Rev*; 231: 88-98.
- Sheng M, Pak DT. (2000) Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annu Rev Physiol*; 62: 755-78.
- White N, Burnstock G. (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*; 27: 211-7.

Chapitre 16

Signalisation par l'oxygène et l'oxyde nitrique

Introduction

L'oxygène est avant tout le comburant indispensable à la vie animale et la source d'énergie indispensable à tous les hétérotrophes, c'est-à-dire les êtres vivants ne pouvant utiliser directement l'énergie solaire comme le font les végétaux chlorophylliens. L'apport d'oxygène doit être finement régulé, car les insuffisances sont dommageables comme le sont les excès : l'hypoxie met en danger la vie cellulaire par défaut d'apport énergétique, et certaines formes réactives de l'oxygène, les ROS (*Reactive oxygen species*) la mettent également en danger en raison de leur toxicité. Afin d'informer l'organisme des risques d'hypoxie ou de stress oxydatif, une signalisation peut être mise en œuvre, dont l'étude est l'objet de ce chapitre. En liaison avec le stress oxydatif, une forme spéciale oxydée de l'azote, l'oxyde nitrique, est un véritable messager intracellulaire, aux effets multiples, qui sera également étudié ici.

La cellule tumorale est très sensible aux effets de l'hypoxie comme à ceux du stress oxydatif : elle réagira à la première en stimulant la vascularisation tumorale (angiogénèse), la production d'énergie indépendamment de l'oxygène, ou encore l'épargne de la synthèse protéique ; elle réagira à la seconde en mettant en œuvre des voies de signalisation encore incomplètement connues. Les formes réactives de l'oxygène apparaissent comme une épée à double tranchant, impliquées dans la cancérogenèse, mais peut-être utilisables pour lutter contre les cancers.

L'hypoxie

La principale signalisation mise en place en réponse à l'hypoxie est liée à l'activation d'un facteur de transcription, l'HIF (*Hypoxia-inducible factor*), qui induit l'expression d'un ensemble de gènes destinés à remédier à cette situation. C'est la quantité d'oxygène disponible qui est elle-même le signal permettant l'activation de l'HIF ; l'oxygène apparaît ainsi comme une véritable molécule de signalisation, un messager induisant la mise en place de réponses appropriées.

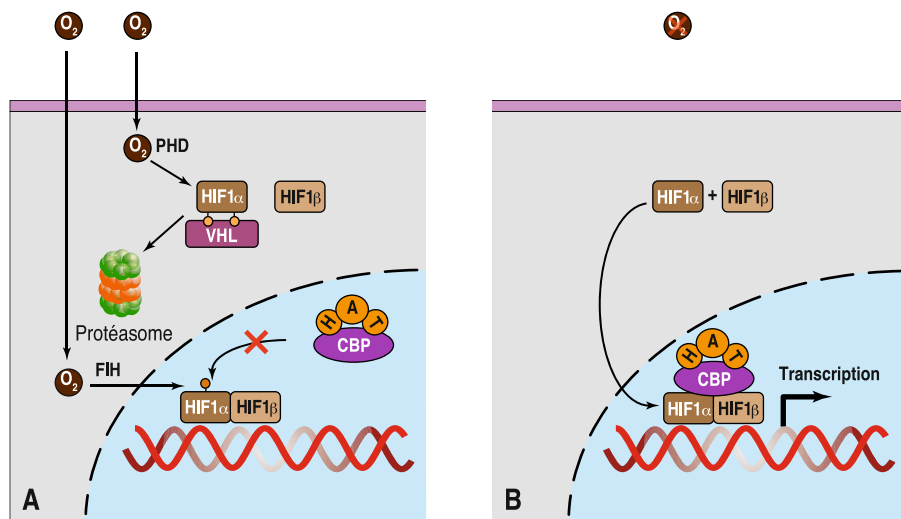


Fig. 16-1 – La signalisation de l'hypoxie.

En présence d'oxygène (A), le facteur de transcription HIF1 α est hydroxylé dans le cytoplasme sur deux résidus prolines ; cela permet sa reconnaissance par la protéine VHL, qui fait partie d'un complexe E3 qui le dirige vers le protéasome. En outre, HIF1 α est hydroxylé dans le noyau sur une asparagine, ce qui empêche sa reconnaissance par l'activateur de transcription CBP qui permet l'acétylation des histones.

En absence d'oxygène (B), ces hydroxylations ne peuvent avoir lieu ; HIF1 α est stabilisé et peut migrer dans le noyau, reconnaître son partenaire HIF1 β et initier la transcription *via* la fixation de l'activateur de transcription CBP.

Activation et rôle de l'HIF

L'HIF est un complexe hétérodimérique composé d'une sous-unité α sensible à l'oxygène et d'une sous-unité β insensible à l'oxygène. Il existe trois sous-unités α et deux sous-unités β distinctes. En présence d'une concentration suffisante en oxygène, il existe une hydroxylation post-traductionnelle de certains acides aminés de la sous-unité α qui la conduit vers l'ubiquitinylation et le protéasome (voir Annexe C). Une diminution de la disponibilité en oxygène entraîne une diminution de cette hydroxylation et une migration vers le noyau de la sous-unité α qui peut alors, associée à la sous-unité β , exercer ses fonctions sur la transcription de ses gènes cibles. Il existe de nombreuses voies de signalisation qui activent la transcription des HIF, en particulier les voies de prolifération ouvertes par les MAP kinases et la PI3 kinase (chapitres 2 et 3) ; de nombreux facteurs de transcription induisent ainsi la synthèse des messagers de HIF, comme MYC ou NF κ B.

Les sous-unités α possèdent un domaine ODDD (*Oxygen-dependent degradation domain*) contenant deux résidus proline hydroxylés par une prolyl-4-hydroxylase (PHD), et un domaine C-terminal contenant un résidu asparagine hydroxylé par une protéine appelée FIH (*Factor inhibiting HIF*). Ces deux enzymes sont des dioxygé-

nases non héminiques utilisant comme substrats l'oxygène moléculaire et l' α -céto-glutarate, et comme cofacteur le fer ferreux Fe^{2+} . C'est le défaut de leur substrat O_2 qui est l'origine de la diminution de leur activité au cours de l'hypoxie. Les prolines hydroxylées sont reconnues par la protéine VHL (*de von Hippel-Lindau disease*), qui fait partie d'une ubiquitine ligase E3 appelée VBC (*VHL-elongin B-elongin C*), qui permet au HIF α d'être conduit vers le protéasome. L'hydroxylation de l'asparagine, quant à elle, empêche la fixation sur HIF α d'un co-activateur de son activité transcriptionnelle, CBP (*CREB-binding protein*), qui joue le rôle d'une histone acétyl-transférase (voir Annexe B).

Une fois dans le noyau, les sous-unités HIF α et HIF β s'associent par l'intermédiaire de leurs domaines N-terminaux et se fixent sur l'ADN *via* un site HLH (*Helix-loop-helix*, Annexe B) sur une séquence HRE (*Hypoxia responsive element*) appartenant au promoteur des gènes cibles. C'est au niveau C-terminal que se trouve le domaine de transactivation (TAD), dédoublé pour les HIF1 α et HIF2 α en un N-TAD indépendant de l'hydroxylation et un C-TAD inhibé par hydroxylation d'un résidu asparagine par FIH. Quant à la sous-unité HIF3 α , elle pourrait jouer un rôle dominant négatif sur la transcription induite par les autres sous-unités α . Le gène cible le mieux connu des protéines HIF est celui du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*, chapitre 1). Les HIF apparaissent ainsi comme des régulateurs fondamentaux de l'angiogenèse. Plusieurs dizaines de gènes cibles sont en outre sous la dépendance des HIF, impliqués en particulier dans le métabolisme énergétique, l'érythropoïèse, la vasodilatation, l'autophagie, toutes opérations pour lesquelles la disponibilité en oxygène est capitale.

Conséquences de l'hypoxie sur l'angiogenèse tumorale

L'hypoxie représente le signal le plus important de promotion de l'angiogenèse. L'angiogenèse est indispensable à la croissance des tumeurs au-delà d'une taille de quelques millimètres, car les vaisseaux peuvent seuls apporter à la tumeur l'oxygène et les nutriments nécessaires. En absence de vascularisation, les zones profondes des tumeurs ne disposent pas de ces apports et deviennent rapidement nécrotiques, limitant la croissance tumorale. La néo-angiogenèse représente l'un des facteurs majeurs de l'oncogenèse et son ciblage, suggéré de longue date comme pouvant apporter une arme thérapeutique importante, a permis effectivement des approches originales de traitement des cancers.

Une surexpression d'HIF est communément rencontrée dans les cancers humains, parfois associée à un pronostic défavorable. S'il n'existe pas de mutations activatrices connues des gènes codant pour les diverses sous-unités des HIF, une mutation de type « perte de fonction » peut survenir au niveau du gène *VHL*, tout particulièrement dans les cancers du rein où elle est fréquente. En absence de l'activité de l'E3 ubiquitine ligase correspondante, la stabilisation des sous-unités α des HIF est augmentée et son incidence sur la croissance tumorale majorée. Les agents anti-angiogéniques comme le bévacizumab, un anticorps anti-VEGF (chapitre 1), ont fait la preuve de leur activité dans cette pathologie tumorale et dans d'autres.

Conséquences de l'hypoxie sur le métabolisme énergétique tumoral

Parmi les gènes cibles des HIF figurent des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme anaérobie du glucose. Rappelons que, pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP, le glucose peut être pris en charge par une voie principale, nécessitant de l'oxygène, la phosphorylation oxydative mitochondriale, et par une voie généralement secondaire, la glycolyse anaérobie cytosolique. Cette dernière est certes moins rentable sur le plan énergétique (deux molécules d'ATP formées par molécule de glucose au lieu de trente-huit), mais elle peut avoir un grand intérêt pour les cellules en situation hypoxique. En favorisant l'uptake du glucose et son engagement vers la glycolyse, les facteurs HIF permettent la survie des cellules hypoxiques. Il est connu depuis fort longtemps que les cellules tumorales ont un taux de glycolyse anaérobie élevé, même en situation de normoxie (effet Warburg) ; cela peut représenter une préadaptation au risque d'hypoxie, sélectionnée génétiquement au cours d'épisodes répétés d'hypoxie suivis de réoxygénation.

S'il n'existe pas, actuellement, de moyens de cibler les tumeurs par des agents qui tueraient sélectivement les cellules privilégiant la glycolyse anaérobie par rapport à la phosphorylation oxydative, cette particularité des cellules tumorales est mise à profit en cancérologie dans le cadre d'une technique d'imagerie tomographique utilisant un émetteur de positons, le 2-désoxy-2-¹⁸F-glucose, un dérivé non métabolisable du glucose marqué au fluor 18.

Autres conséquences de l'hypoxie

Parmi les nombreux gènes régulés par les HIF figure le gène DDIT4 (*DNA-damage-inducible transcript 4*) codant pour la protéine REDD1/RTP801 (*Regulated in development and DNA damage responses*). Cette protéine active le fonctionnement du complexe TSC1-TSC2, lui-même inhibiteur de l'activation, par la petite protéine G RHEB, de la protéine MTOR, que l'on sait être impliquée dans la synthèse protéique, la croissance cellulaire et l'autophagie (chapitre 3). L'hypoxie est donc pour la cellule un moyen de réduire la synthèse protéique de la cellule et de protéger sa survie par la pratique de l'autophagie.

D'autres cibles potentielles des HIF sont des gènes impliqués dans le déclenchement de l'apoptose (chapitre 18), *via* l'ouverture du pore de transition permettant la sortie du cytochrome *c* de la mitochondrie : des protéines de la famille BNIP (*BCL2-interacting protein*) interagissant avec BCL2 sont en effet induites par les HIF. Il semble que cette induction de l'apoptose puisse être mise en œuvre lorsque la cellule en état d'hypoxie ne peut envisager de survie.

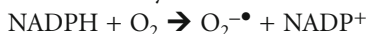
Enfin, de nombreuses protéines jouant un rôle fondamental dans l'adhésion et la migration cellulaires sont également induites par les HIF : vimentine (VIM), fibronectine (FN), kératines (KRT), métalloprotéinases (MMP), cathepsines (CTS). Indirectement, la E-cadhérine (CDH1, chapitre 7), qui joue un rôle majeur dans la répression de la transition épithélio-mésenchymateuse, est réprimée elle-même lors

de l'activation des HIF. L'hypoxie est donc impliquée de façon importante dans les phénomènes métastatiques.

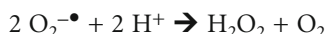
Le stress oxydant

Génération des formes réactives de l'oxygène (ROS)

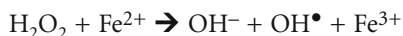
Les ROS sont produits de façon endogène à partir de l'oxygène moléculaire, au niveau de plusieurs organelles, tout particulièrement la mitochondrie qui est le lieu privilégié d'utilisation de l'oxygène. Ils sont représentés principalement par trois espèces chimiques, le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle OH^{\bullet} et la molécule de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . L'ion superoxyde est formé par réduction mono-électronique de l'oxygène moléculaire lors d'une réaction catalysée par des enzymes au premier rang desquelles figurent les oxydoréductases de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et les NADPH oxydases membranaires (NOX) :



L'ion superoxyde est déttoxiqué par les superoxyde dismutases (SOD), la Cu^{2+} - Zn^{2+} -SOD, localisée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et la Mn^{2+} -SOD, localisée dans la matrice mitochondriale. Cette dismutation génère le peroxyde d'hydrogène selon la réaction :



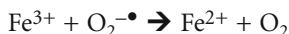
Le peroxyde d'hydrogène est lui-même déttoxiqué par l'action de diverses enzymes : catalases (CAT) et peroxyrédoxines (PRDX). Toutefois, en présence de certains ions métalliques, comme le fer ferreux, mais aussi le cuivre, le chrome ou le cobalt, le peroxyde d'hydrogène peut entrer dans une réaction générant le radical hydroxyle OH^{\bullet} , la réaction de Fenton :



La réaction d'Haber-Weiss est également susceptible de générer le radical OH^{\bullet} :



Cette réaction combine en fait la réaction de Fenton avec la réduction du fer ferrique par l'ion superoxyde :



Le radical hydroxyle est une espèce chimique très réactive, avec une demi-vie en milieu aqueux de moins de 1 ns. Il réagira donc instantanément très près de son lieu de formation et attaquera indifféremment toutes les régions moléculaires riches en électrons, lipides, protéines et acides nucléiques, d'autant plus qu'il n'existe aucun mécanisme de déttoxication de ce radical. Il s'ensuit la formation, au niveau de ces molécules, de radicaux peroxydes ROO^{\bullet} . Ces derniers peuvent être déttoxiqués par les peroxyrédoxines, la thiorédoxine (TXN) et d'autres enzymes, comme les glutathion peroxydases (GPX) qui catalysent la réaction (fig. 16-2) :



Les ROS peuvent également être à l'origine d'oxydations plus ménagées des protéines, au niveau desquelles ils peuvent créer des ponts disulfure que glutathion ou thiorédoxine peuvent également détoxifier (fig. 16-2).

Rôle des ROS dans la cancérogenèse et la thérapie anticancéreuse

Au niveau des acides nucléiques, les ROS sont à l'origine de nombreux produits d'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, le plus fréquent étant la 8-hydroxyguanine (voir Annexe A). Les ROS apparaissent ainsi comme des agents mutagènes et cancérogènes et la protection contre les ROS comme une voie de prévention des cancers. De nombreux antioxydants comme l'acide ascorbique ou le β -carotène et des « scavengers » des ROS comme le resvératrol, la N-acétylcystéine ou la quercétine ont été proposés comme thérapie parallèle des cancers sans le moindre succès jusqu'à

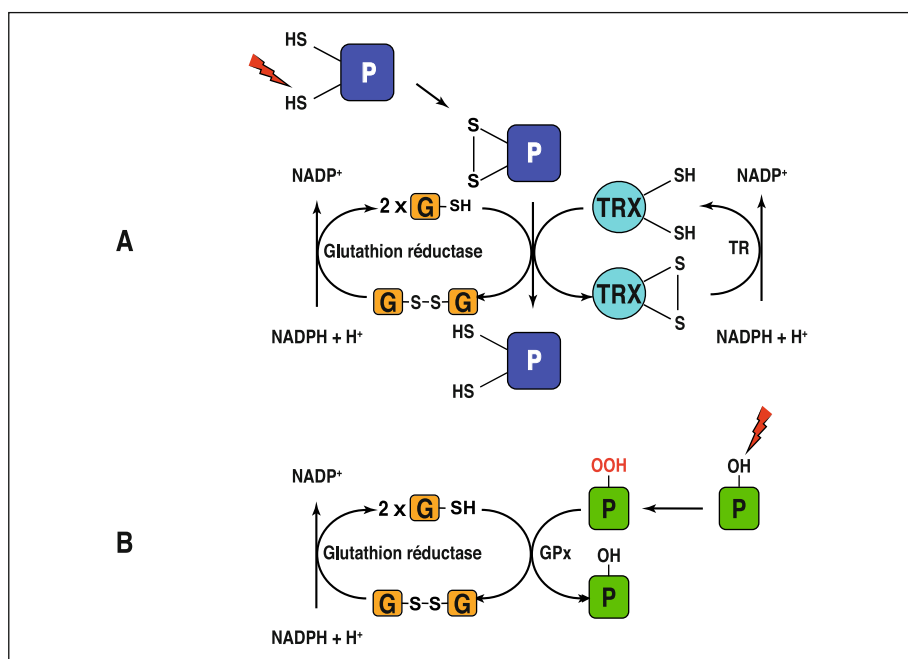


Fig. 16-2 – Détoxification des oxydations provoquées par les ROS.

A. Les ROS peuvent attaquer les fonctions thiol de résidus cystéine de protéines P et former des ponts disulfure. Le glutathion réduit G-SH est capable de réduire ces ponts disulfure en fonctions thiol en formant du glutathion oxydé G-S-S-G. Le glutathion réduit est régénéré grâce à une flavoprotéine à NADP réduit, la glutathion réductase GR. La thiorédoxine peut jouer le même rôle que le glutathion ; elle est régénérée par une thiorédoxine réductase TR. La formation de ponts disulfure sur certaines protéines, y compris la thiorédoxine, peut être le point de départ d'une voie de signalisation.

B. Les ROS peuvent oxyder des fonctions hydroxylées portées par des protéines P pour former des peroxydes. Le glutathion peroxydase GPx est capable de réduire les peroxydes en oxydant le glutathion réduit G-SH en glutathion oxydé G-S-S-G.

présent. Les ROS sont également formés par l'action des radiations ionisantes sur la molécule d'eau. Ils sont considérés comme un des modes majeurs de la cytotoxicité générée par la radiothérapie. L'effet des radiations ionisantes est grandement majoré par l'oxygénation des tissus irradiés (« effet oxygène »), et la potentialisation de la radiothérapie par une meilleure oxygénation des tumeurs a fait l'objet de nombreux travaux. Des agents générant spécifiquement des ROS au niveau des tumeurs sont également proposés en thérapeutique.

Rôle des ROS dans la signalisation cellulaire

Les ROS, en dehors de leur action délétère, peuvent agir en tant que molécules de signalisation et contrôler de nombreux processus physiologiques : prolifération, différenciation, adhésion, migration, apoptose. En amont, divers facteurs de croissance et cytokines sont susceptibles d'entraîner la formation de ROS en activant la transcription des NADPH oxydases. En aval, les ROS réalisent l'oxydation, au niveau de résidus cystéine, de kinases et de phosphatases diverses, modulant ainsi leur activité. Un autre niveau de régulation est assuré par les protéines de détoxication prenant en charge les ROS, comme les SOD. Un premier exemple est fourni par l'activation par les ROS de la MAP3K nommée ASK1 (*Apoptotic signal - regulated kinase 1*) qui est en amont des voies JNK et p38 (chapitre 2). Cette kinase est maintenue inactive par une liaison avec la thiorédoxine. Cette dernière est activée par les ROS au niveau des fonctions thiol de deux cystéines pour former un pont disulfure, ce qui libère ASK1 et lui permet d'initier la cascade des MAP kinases. Un deuxième exemple est fourni par les facteurs de transcription NFκB (chapitre 11), qui sont désactivés par oxydation par les ROS de thiols de résidus cystéine en ponts disulfure. Un autre groupe de facteurs de transcription, FOXO (*Forkhead box class O*, chapitre 3), sont spécifiquement activés par le peroxyde d'hydrogène et induisent la mort cellulaire ou un état de quiescence caractérisé par une tolérance au stress oxydatif. Les peroxyrédoxines et la thiorédoxine sont capables de réduire ces protéines oxydées et participent ainsi à la régulation de ces voies de signalisation cellulaire.

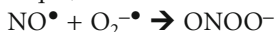
Il se pose évidemment le problème de la spécificité dans ce rôle de signalisation de molécules très réactives ; si l'on peut concevoir, en raison de leur durée de vie, une certaine spécificité de l'ion superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène, cela n'est pas possible pour le radical hydroxyle. La signalisation *via* les ROS reste très controversée. Les bactéries ont développé de véritables systèmes de réponse aux ROS avec des récepteurs de haute affinité qui sont maintenant bien individualisés. Il ne semble pas en être de même pour les mammifères, chez lesquels les réponses aux ROS semblent plus diffuses et moins spécifiques, s'exerçant au niveau de quelques facteurs de transcription comme MYC, NFκB, FOXO, p53 et un coactivateur du PPAR (chapitre 14) appelé PGC1 (*PPAR gamma coactivator*). Les données actuelles sont insuffisantes pour donner une vue globale et bien systématisée de la signalisation par les ROS chez les mammifères.

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote

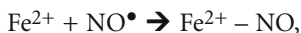
Génération du NO•

L'oxyde nitrique NO• est un composé radicalaire gazeux, très diffusible, de faible poids moléculaire, de demi-vie limitée à quelques secondes en milieu aqueux, toutes caractéristiques qui ont longtemps fait douter de sa qualité de messager intracellulaire. Il est produit par les NO synthases (NOS), qui sont au nombre de trois : la neuronale (nNOS), l'endothéliale (eNOS) et l'inductible (iNOS), à partir de l'arginine comme donneur d'azote, de l'oxygène moléculaire et du NADPH comme donneur d'électrons. Ces enzymes sont des protéines héminiques, partageant une certaine similarité avec les cytochromes, et agissent sous forme de dimères. Elles sont l'objet de modifications post-traductionnelles (acylation, phosphorylation, Annexe C). Elles sont activées par le Ca²⁺ par l'intermédiaire de la calmoduline (chapitre 15) et par certaines kinases comme AKT. L'iNOS est induite en réponse à divers stimulus transcriptionnels, comme certaines cytokines ou le NFκB (chapitre 12), et au contraire réprimée par d'autres facteurs de transcription comme p53.

Le NO• est produit en réponse à diverses stimulations endothéliales ou nerveuses ; il est capable de diffuser rapidement et exerce donc des effets paracrines, sur les cellules immédiatement voisines de celles où il est produit, fréquemment des cellules musculaires lisses. Le NO• joue de nombreux rôles physiologiques au niveau vasculaire (flux, perméabilité, angiogenèse, etc.) et dans la transmission neuronale. Il est cytotoxique à forte concentration et exerce des effets pro- et antiprolifératifs selon le contexte. Il est capable de réagir avec l'ion superoxyde pour donner l'ion peroxynitrite ONOO⁻, très réactif et toxique, selon la réaction :



ainsi qu'avec des protéines héminiques comme les guanylyl cyclases (voir ci-après) :



sur lesquelles il peut entrer en compétition avec un autre ligand des hèmes, le monoxyde de carbone CO. Il est enfin capable de provoquer la nitrosylation de protéines au niveau de résidus cystéine, pour former un adduit -SNO.

Réponses cellulaires au NO•

La cible principale du NO• est la guanylyl cyclase cytoplasmique (GUCY), une enzyme qui, à l'instar de l'adénylyl cyclase (chapitre 6), est capable de convertir le GTP en GMP cyclique (cGMP), lui même dégradé en GMP par une phosphodiesterase. Les GUCY sont des hétérodimères αβ, et il en existe sept isoformes, dont une seule cytoplasmique. L'oxyde nitrique se fixe sur le fer ferreux de l'hème et active l'enzyme.

Le cGMP est capable de contrôler le fonctionnement de canaux cationiques, de protéines kinases, ainsi que de certaines phosphodiesterases. Il existe une petite

famille de sérine/thréonine kinases, les PKG ou PRKG, qui sont spécifiquement activées par le cGMP. Les effets du cGMP sur la relaxation du muscle lisse, la neurotransmission, l'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires sont maintenant bien répertoriés et sont depuis longtemps utilisés en pharmacologie : la trinitroglycérine, capable de générer l'oxyde nitrique, est utilisée depuis plus de cent cinquante ans comme vasodilatateur coronarien et le sildénafil, un inhibiteur de phosphodiesterase, est utilisé depuis quelques années comme vasodilatateur des tissus érectiles.

Un autre mode d'action du NO• est à rechercher au niveau de la nitrosylation de protéines, un phénomène encore relativement mal connu. La nitrosylation de la caspase 3 inhibe son activité, alors que la nitrosylation de RAS entraîne une activation de la cascade des kinases. Signalons également que la nitrosylation du facteur HIF α entraîne sa stabilisation, mimant ainsi les effets de l'hypoxie.

L'oxyde nitrique dans la cancérogenèse et la thérapeutique anticancéreuse

Du fait de la localisation endothéliale d'une des NOS, le NO• est un médiateur important de l'angiogenèse. Par l'intermédiaire du cGMP et des PKG, il est capable d'activer la prolifération des cellules endothéliales *via* la voie des MAP kinases (chapitre 2) en activant la protéine RAF. Par l'intermédiaire de la nitrosylation de RAS, il est également capable d'activer les voies de prolifération.

Au niveau des cellules tumorales, l'expression de la NOS inductible peut avoir les mêmes conséquences sur la prolifération et la migration cellulaires que l'expression de eNOS dans les cellules endothéliales. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus et il paraît difficile de faire de la voie du NO• une voie pro-oncogénique.

Deux types d'approche pharmacologique ont été développés : le premier vise à diminuer la production du NO• par des inhibiteurs des NOS ; il existe plusieurs voies possibles, en particulier des peptides mimant la structure de la cavéoline. Le second vise à générer des concentrations intratumorales élevées de NO• afin de profiter de son effet cytotoxique.

Bibliographie

- Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. (2006) The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*; 93: E73-80.
- Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. (2009) HIF at a glance. *J Cell Sci*; 122: 1055-7.
- D'Autréaux B, Toledano MB. (2009) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8: 813-24.
- Fang J, Seki T, Maeda H. (2009) Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev*; 61: 290-302.
- Foster MW, Hess DT, Stamler JS. (2009) Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med*; 15: 391-404.
- Giaccia A, Siim BG, Johnson RS. (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 803-11.

- Hancock JT. (2009) The role of redox mechanisms in cell signalling. *Mol Biotechnol*; 43: 162-6.
- Kamata T. (2009) Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Sci*; 100: 1382-8.
- Murad F. (2006) Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*; 355: 2003-11.
- Ruan K, Song G, Ouyang G. (2009) Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*; 107: 1053-62.
- Semenza GL. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 3: 721-32.
- Trachootham D, Alexandre J, Huang P. (2009) Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*; 8: 579-91.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J *et al.* (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*; 160: 1-40.
- Wu WS. (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*; 25: 695-705.

Chapitre 17

Les voies de contrôle du cycle cellulaire

Introduction

Le cycle cellulaire constitue l'ensemble des événements qui séparent la naissance d'une cellule de celle des deux cellules filles qui en sont issues. Il intègre un cycle de croissance continu (augmentation de la masse cellulaire) et un cycle de division ou cycle chromosomique discontinu (réplication de l'ADN et répartition du génome dans les deux cellules filles). L'entrée dans le cycle de division représente donc l'exécution du programme de prolifération cellulaire, en réponse aux messages apportés par les facteurs de croissance, que nous avons étudiés dans les chapitres précédents. La transduction de ces messages aboutit en effet, entre autres, à la transcription de gènes nécessaires à l'initiation du cycle cellulaire, la cycline D1 par exemple. Le contrôle du cycle cellulaire est d'une importance capitale dans l'oncogenèse, qui s'accompagne d'une perturbation de la régulation normale du cycle.

Nous ne présenterons ici que les voies de déclenchement et de contrôle de l'avancement du cycle cellulaire et nous ne décrirons pas les événements eux-mêmes sur le plan moléculaire (réplication de l'ADN, mitose). Après avoir décrit brièvement les événements survenant au cours des différentes phases du cycle, nous présenterons les acteurs intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, puis les processus de contrôle eux-mêmes avant d'évoquer les perturbations pathologiques de la régulation du cycle cellulaire. Du cycle cellulaire n'étaient connues au départ que la mitose et l'interphase ; la réplication de l'ADN a ensuite été reconnue comme une phase active, séparée de la mitose par deux « intervalles » ou *gaps*. Ces intervalles ne sont en aucun cas des phases de repos, mais des moments où se préparent activement les événements conduisant à la réplication de l'ADN ou à la mitose.

Les phases du cycle cellulaire

La phase G1 (Intervalle entre mitose et synthèse de l'ADN)

C'est la phase la plus longue et la plus variable du cycle. Si les nutriments font défaut ou si les cellules reçoivent un stimulus antiprolifératif, tel qu'un signal de commande d'une différenciation terminale, les cellules peuvent retarder leur progression dans le cycle ou sortir du cycle et entrer en quiescence (phase G0). La progression à travers G1 est régulée par un point de contrôle (*checkpoint*) des lésions de l'ADN en G1. Quand les cellules l'ont franchi, le cycle est amorcé sans qu'il y ait possibilité de l'interrompre. La préparation de la réplication de l'ADN se fait par la dé-répression de facteurs de transcription des gènes nécessaires à cette réplication. Cette dé-répression implique leur libération à partir de protéines qui les retiennent inactifs que l'on appelle les « *pocket proteins* ». La synthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques qui seront incorporés dans l'ADN nécessite en particulier des enzymes comme la dihydrofolate réductase, la thymidylate synthase et bien d'autres.

La phase S (Synthèse de l'ADN)

La réplication de l'ADN est initiée simultanément à de nombreux sites différents, appelés origines de réplication. Chaque région du chromosome répliquée à partir d'un site donné est appelée réplicon. Chaque groupe de réplicons se réplique à un instant caractéristique de la phase S, en général au début pour les régions du génome transcrites activement, tandis que les régions d'hétérochromatine inactive se répliquent plus tard.

Durant la phase G1, les chromosomes se modifient afin d'obtenir « l'autorisation » de se répliquer par la liaison de protéines particulières aux origines de réplication pour former un complexe de pré-réplication. Au fur et à mesure de la réplication, ces complexes sont inactivés, empêchant ainsi les régions du chromosome de se répliquer deux fois au cours d'un même cycle. Les étapes de la phase S (voir Annexe A) comportent l'ouverture de la double hélice (hélicases, topoisomérase 2), la synthèse d'ADN (primase, polymérases, etc.). Outre ces enzymes, interviennent de nombreuses protéines associées aux processus d'initiation, d'élongation et de terminaison, ainsi que des histones pour l'empaquetage de l'ADN dans les nucléosomes.

La phase G2 (Intervalle entre synthèse de l'ADN et mitose)

Au cours de la phase G2, les cellules corrigent la structure de l'ADN et se préparent à la mitose. Si de l'ADN endommagé ou non répliqué est détecté au point de contrôle (*checkpoint*) des lésions de l'ADN en G2, une cascade de protéine kinases se déclenche, aboutissant à l'inactivation de la progression des cellules dans le cycle. Par ailleurs des mécanismes de protection empêchent la cellule de redémarrer un processus de synthèse de l'ADN tant qu'une mitose n'a pas été mise en œuvre.

La phase M (Mitose)

Au cours de la phase M et de la cytotédiérèse qui s'ensuit, les chromosomes et le cytoplasme se divisent pour former deux cellules filles. La ségrégation des chromosomes est contrôlée par le point de contrôle de la métaphase, qui retarde le début de la séparation des chromatides sœurs jusqu'à ce que les chromosomes soient correctement alignés sur la plaque équatoriale du fuseau mitotique.

La mitose se compose de cinq phases :

- la *prophase*, ou début de condensation des chromosomes et formation du fuseau mitotique ;
- la *prométaphase*, avec résorption de l'enveloppe nucléaire et fixation aléatoire des chromosomes aux microtubules émanant des deux pôles du fuseau mitotique ;
- la *métaphase*, avec alignement des chromosomes à mi-distance entre les deux pôles ;
- l'*anaphase*, phase de séparation des deux chromatides sœurs et migration en direction des deux pôles du fuseau ;
- la *télophase*, où l'enveloppe nucléaire se reforme autour de la chromatine. Au cours de cette phase, un anneau contractile d'actine et de myosine s'assemble dans le cortex, à mi-distance entre les deux pôles, et resserre la zone équatoriale. Ce processus, appelé cytotédiérèse, sépare les deux cellules filles l'une de l'autre.

Les protéines effectrices du contrôle du cycle cellulaire

Les cyclines et les kinases cycline-dépendantes

Les cyclines sont des protéines assez volumineuses (35 à 90 kDa), n'ayant pas d'activité catalytique propre, mais indispensables au fonctionnement de kinases, appelées pour cette raison « cycline-dépendantes ». Leur structure de base est constituée de deux domaines symétriques centraux comportant cinq hélices α . Un de ces domaines appelé boîte de la cycline (*cyclin box*) est hautement conservé et constitue la caractéristique structurale de ces protéines. Les cyclines ont une production cyclique, d'où leur nom, et chacune est présente dans la cellule à un moment précis du cycle cellulaire : la cycline D en phase G1 (et généralement au-delà), la cycline E en fin de phase G1, la cycline A pendant la phase S et la phase G2, la cycline B pendant la phase M. La synthèse et la dégradation des cyclines suivent donc une régulation particulière, qui fait intervenir des facteurs de transcription pour leur synthèse et des ubiquitine ligases pour leur dégradation dans le protéasome.

Les kinases cycline-dépendantes (*Cyclin-dependent kinase*, CDK) sont des protéines de plus petite taille (de 30 à 40 kDa) ayant une activité catalytique de sérine/thréonine kinase qui n'est possible qu'en association avec une cycline. La liaison de la cycline à la CDK provoque un changement de structure de celle-ci, permettant à l'ATP du site actif de réagir avec les substrats. Les CDK sont présentes en quantité constante tout au long du cycle cellulaire : c'est donc bien la présence d'une cycline pour les activer qui constitue l'événement décisif pour qu'ils exercent

leur activité. Le CDK4 ou le CDK6 s'associent à la cycline D en phase G1, le CDK2 à la cycline A en fin de phase G1 et en phase S, le CDK1 à la cycline A pendant la phase G2, puis à la cycline B en phase M. La figure 17-1 présente l'intervention des couples cycline-CDK dans la progression du cycle cellulaire.

Chaque couple cycline-CDK possède ainsi une spécificité de phase ainsi qu'une spécificité quant aux substrats qu'il est capable de phosphoryler. Certains de ces substrats sont bien connus, par exemple la protéine RB1 (*Retinoblastoma protein 1*) pour le complexe cycline D-CDK4/6 (voir plus loin), mais tous les substrats sont loin d'être identifiés. De façon générale, les substrats des complexes cycline-CDK sont soit des protéines catalytiques intervenant de façon spécifique pour réaliser une opération en liaison avec le cycle, soit des facteurs de transcription permettant la production de protéines nécessaires à de telles opérations. Certains couples cycline-CDK interviennent comme activateurs d'autres couples cycline-CDK : c'est le cas du couple cycline H-CDK7 qui, associé à une troisième protéine, MAT1 (*Ménage à trois 1*), phosphoryle le complexe cycline D-CDK4/6 et le complexe cycline B-CDK1, pouvant les rendre jusqu'à trois cents fois plus actifs. C'est pour cette raison que le CDK7 a été

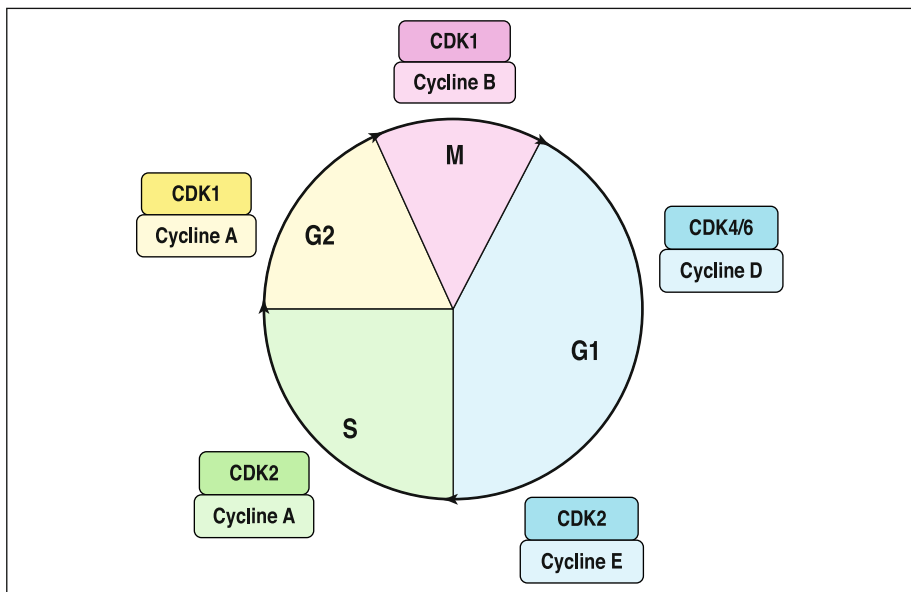


Fig. 17-1 – Les complexes CDK-cycline et leur intervention dans le cycle cellulaire.

Les cyclines sont produites à des moments précis du cycle cellulaire ; en s'associant avec une kinase cycline-dépendante CDK, elles permettent à cette dernière de phosphoryler des substrats nécessaires à la progression des cellules dans le cycle. Le complexe CDK4/6- cycline D permet l'avancement des cellules dans la phase G1, le complexe CDK2-cycline E permet l'entrée en phase S, les complexes CDK2-cycline A et CDK1-cycline A sont présents pendant les phases S et G2, respectivement. Le complexe CDK1-cycline B apparaît en phase G2 et constitue le facteur déclenchant de la mitose.

également appelé CAK (*CDK-activating kinase*). Le complexe CAK intervient également dans la réparation de l'ADN (Annexe A) et ne peut activer une mitose tant que cette réparation n'est pas effectuée.

Les kinases inhibitrices WEE1 et MYT1

À côté des systèmes kinasiques activateurs du cycle que sont les complexes cycline-CDK, il existe des kinases inhibitrices de l'avancée des cellules dans le cycle. La kinase WEE1 (d'un mot écossais signifiant « petite ») phosphoryle les CDK sur une tyrosine (la tyrosine 15 du CDK1) et la kinase MYT1 (*Myelin transcription factor 1*) sur une thréonine (la thréonine 14 du CDK1), acides aminés du site de liaison à l'ATP. Elles inhibent ainsi l'activité kinasique des CDK, qui devra être réactivée grâce à une phosphatase CDC25 (voir ci-dessous). Les kinases WEE1 et MYT1 sont désactivées par phosphorylation par la protéine AKT, un élément clé de la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), ainsi que par ubiquitinylation, ce qui les conduit vers le protéasome (Annexe C).

Les phosphatases

Aux deux types de kinases, activatrices et inhibitrices, correspondent deux types de phosphatases, inversement inhibitrices et activatrices, qui hydrolysent le groupement phosphate apporté par la kinase. Les phosphatases inhibitrices s'opposent donc aux CDK et enlèvent le groupement phosphate d'une sérine ou d'une thréonine ; on les a appelées KAC, par un jeu de mots montrant leur action opposée à celle des CAK. Les phosphatases activatrices enlèvent les groupements phosphates apportés par les kinases WEE1 et MYT1. Ce sont les CDC25 dont on connaît trois isoformes, CDC25A, B et C, dont le substrat est un CDK différent.

La CDC25A semble plutôt intervenir dans la régulation de la transition $G1 \rightarrow S$, tandis que les CDC25B et CDC25C semblent plutôt intervenir dans la régulation de la transition $G2 \rightarrow M$. CDC25C est une cible importante du point de contrôle des lésions de l'ADN en G2. L'activation des complexes cycline-CDK par une phosphatase CDC25 constitue généralement l'événement déclenchant l'activité catalytique des complexes. Ces phosphatases peuvent être activées par phosphorylation par la kinase PLK1 (*Polo-like kinase 1*) et par les complexes cycline-CDK, ce qui entraîne une boucle de régulation positive, et désactivées par phosphorylation, sur d'autres résidus, par les kinases CHK1 et CHK2.

Les inhibiteurs protéiques des CDK

Outre le système de régulation par phosphorylation-déphosphorylation, un système de régulation par interaction protéine-protéine a été identifié. Il est représenté par deux familles de petites molécules inhibitrices de CDK que l'on appelle pour cette raison CKI (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*). La première famille est la famille INK4 (pour inhi-

biteurs de kinases) qui comprend quatre protéines isoformes de poids moléculaire 16, 15, 18 et 19 kDa, codées respectivement par les gènes *INK4a*, *INK4b*, *INK4c*, *INK4d*, que l'on appelle couramment $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, etc., bien que les gènes portent maintenant le nom officiel de *CDKN2A*, *B*, *C* et *D*. Ces protéines inhibent la fixation des cyclines D sur les CDK4 et 6, en modifiant la conformation des molécules CDK et leur site de liaison à l'ATP. La seconde famille porte le nom de CIP/KIP et comprend trois protéines : la protéine $p21^{CIP1}$, la protéine $p27^{KIP1}$ et la protéine $p57^{KIP2}$, ce qui indique à la fois leur poids moléculaire et le nom du gène qui les encode, devenu maintenant *CDKN1A*, *B* et *C*, respectivement. Ces protéines se fixent sur le complexe cycline E-CDK2 et l'inhibent de façon très efficace, d'une part en modifiant la structure de la CDK, d'autre part en se fixant au site de liaison de l'ATP ; en retour, ce complexe phosphoryle les protéines KIP, ce qui permet leur transfert vers le protéasome par le complexe protéique SKP1-SKP2 (*S-phase kinase-associated protein 1/2*). Rappelons que la protéine AKT phosphoryle et inhibe les protéines $p21$ et $p27$ (chapitre 3).

L'intervention des inhibiteurs de CDK joue un rôle fondamental dans la régulation de la croissance au cours des phases G1 et G0 du cycle cellulaire, en provoquant son arrêt en réponse à une lésion de l'ADN ou à des signaux antiprolifératifs, cette inhibition étant levée en présence de signaux de prolifération.

Les mécanismes biochimiques de régulation du cycle cellulaire

Nous avons vu ainsi plusieurs types de mécanismes de régulation des éléments de contrôle du cycle cellulaire : régulation par interaction protéine – protéine (interactions entre cyclines et CDK, interactions entre CKI et complexes cyclines-CDK) ; régulation par phosphorylation-déphosphorylation (rôle des kinases et des phosphatases, intervenant sur des sérines-thréonines ou sur des tyrosines). Nous avons mentionné la régulation du devenir des cyclines, de $p27^{KIP1}$ ou de la tyrosine kinase WEE1, qui disparaissent par protéolyse dans le protéasome, après ubiquitinylation. Il faut enfin mentionner la régulation de l'activité des complexes cycline-CDK par leur translocation du cytoplasme où ils sont formés vers le noyau cellulaire où ils doivent agir. Ce sont des phosphorylations au niveau des cyclines qui semblent responsables de cette translocation. La figure 17-2 présente les principales régulations, positives et négatives, des éléments qui assurent la progression des cellules dans le cycle.

Contrôle des différentes phases du cycle cellulaire

La transition G1 → S et la synthèse de l'ADN

Les mécanismes qui assurent la progression des cellules en phase G1 pour s'engager dans la réplication de l'ADN sont assez bien compris maintenant. La phase G1, loin d'être un simple intervalle, est une phase active pendant laquelle se déroulent des événements décisifs qui entraîneront la cellule vers la multiplication. Ces événements sont schématisés sur la figure 17-3.

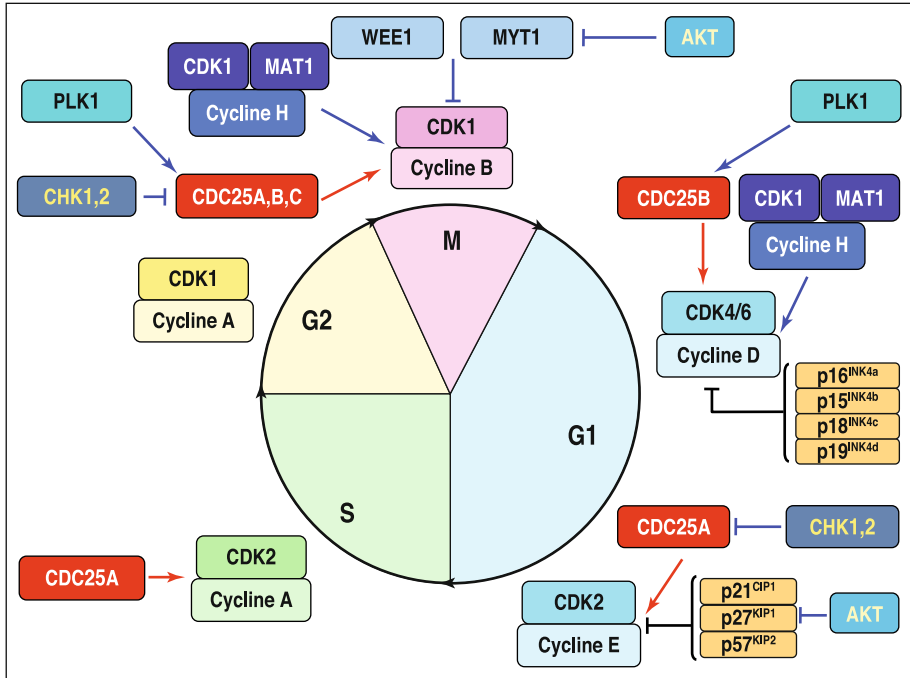


Fig. 17-2 – Régulations positives et négatives s'exerçant sur le cycle cellulaire.

Les complexes CDK-cycline peuvent recevoir une phosphorylation activatrice sur une thréonine de la part du complexe CDK7-cycline H appelé pour cette raison CAK (*CDK activating kinase*) et une phosphorylation inhibitrice sur une tyrosine de la part de la kinase WEE1. Les CDC25 sont des tyrosine phosphatases activant les complexes CDK-cycline ; elles sont inactivées par phosphorylation par les kinases CHK1 et CHK2. Les familles de protéines INK4 et CIP/KIP sont des inhibiteurs des complexes CDK-cycline.

La cycline D est produite grâce à l'action, sur le promoteur de son gène, de facteurs de transcription activés par l'arrivée à la surface de la cellule d'un facteur de croissance (voir chapitres 1 à 3). Cette cycline D va rencontrer dans la cellule des molécules de CDK4 ou de CDK6 et se lier à eux. Ces complexes, inactifs en raison d'une phosphorylation inhibitrice (protéines WEE1 et MYT1) seront activés par une kinase CAK et par une phosphatase CDC25, qui leur permettront d'exercer leur activité catalytique. Cette activité s'exerce essentiellement sur une protéine régulatrice, la protéine RB1 et ses homologues RBL1 et RBL2 (*Retinoblastoma-like proteins 1 et 2*) (p107 et p130) appelées parfois *pocket proteins*. Ces protéines contrôlent l'activité des facteurs de transcription de la famille E2F. À l'état normal (non phosphorylé), RB1 est liée à E2F et le rend inactif, maintenant les cellules en phase G0 ou G1 ; lors de sa phosphorylation, sur plusieurs sites, par le complexe cycline D-CDK4/6, RB1 perd progressivement son affinité pour E2F qui peut ainsi, une fois libéré, exercer son action de facteur de transcription et activer toute une série de promoteurs de gènes nécessaires à la réplication de l'ADN : ADN polymérase, primase, hélicases, etc.

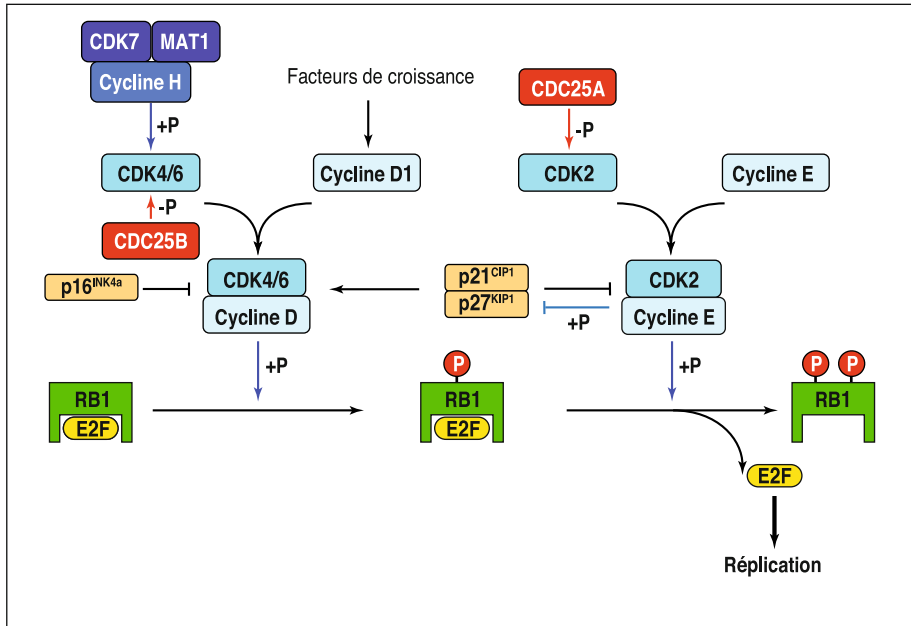


Fig. 17-3 – La transition G1 → S : la phosphorylation des protéines RB.

L'un des rôles majeurs des complexes CDK4/6-cycline D et CDK2-cycline E est de phosphoryler la protéine RB1, qui est alors dissociée des facteurs de transcription E2F, ces derniers étant alors fonctionnels pour activer la transcription des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN.

(Annexe A). La dernière phosphorylation de RB1, qui permet la libération maximale d'E2F, est réalisée par un autre couple cycline-CDK : le couple d'entrée en phase S, cycline E-CDK2.

Rappelons que le système est régulé négativement par les protéines de la famille INK4 (CDKN2) au niveau des complexes cycline D-CDK4/6, et par les protéines de la famille CIP-KIP (CDKN1) au niveau du complexe cycline E-CDK2. De façon intéressante, ces dernières se fixent également sur le CDK4, mais ne l'inhibent pas : elles facilitent la fixation de la cycline D et activent la translocation du complexe dans le noyau. Ainsi, p27^{KIP1} permet la formation du complexe cycline D-CDK4, tout en retardant l'activation du complexe cycline E-CDK2.

L'initiation de la synthèse de l'ADN est réalisée par l'ancrage, au niveau des origines de réplication, de facteurs protéiques assemblés en un ORC (*Origin recognition complex*), puis par l'accrochage du complexe protéique MCM (*Mini-chromosome maintenance*). Outre le complexe cycline E-CDK2, qui phosphoryle un facteur de fixation de l'ADN polymérase α , CDC45, un autre complexe kinasique du même type, associant une protéine de production cyclique, DBF4, à une kinase appelée CDC7, permet la phosphorylation activatrice des protéines MCM. La réplication de l'ADN peut alors se dérouler selon un schéma classique décrit dans l'Annexe A.

La transition G2 → M et la mitose

Les mécanismes d'activation du complexe cycline B-CDK1, anciennement connu sous le nom de MPF (*Mitosis promoting factor*), puis de CDC2, sont résumés sur la figure 17-4. Des phosphorylations inhibitrices, catalysées par les kinases WEE1 et MYT1, sont réalisées sur la tyrosine 15 et la thréonine 14 du CDK1, alors que le complexe CAK cycline H-CDK7 assure une phosphorylation activatrice sur la thréonine 161. Les kinases WEE1 et MYT1 sont ensuite désactivées par phosphorylation par la protéine AKT et entraînées vers le protéasome par une protéine TOME1 (*Trigger of mitotic entry*) associée au facteur SKP1. Une fois lié à la cycline B, le complexe est inactif tant que la tyrosine phosphatase CDC25 n'a pas détaché le phosphate en 15. Grâce à des interactions de la cycline B avec d'autres protéines, le complexe cycline B-CDK1 peut migrer vers le noyau et y mettre en œuvre l'ensemble des phosphorylations requises pour la réalisation de la mitose (histones impliquées dans la décondensation des chromosomes, lamine, nucléoline, condensine, kinésine, peroxyrédoxine, etc., ainsi que des protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette pendant la mitose). D'autres régulations de l'activité du complexe cycline B-CDK1 sont exercées par des kinases comme la PLK1 qui phosphoryle et active la cycline B, et les kinases Aurora A (qui active par phosphorylation la PLK1), Aurora B et Aurora C (AURKA, B et C).

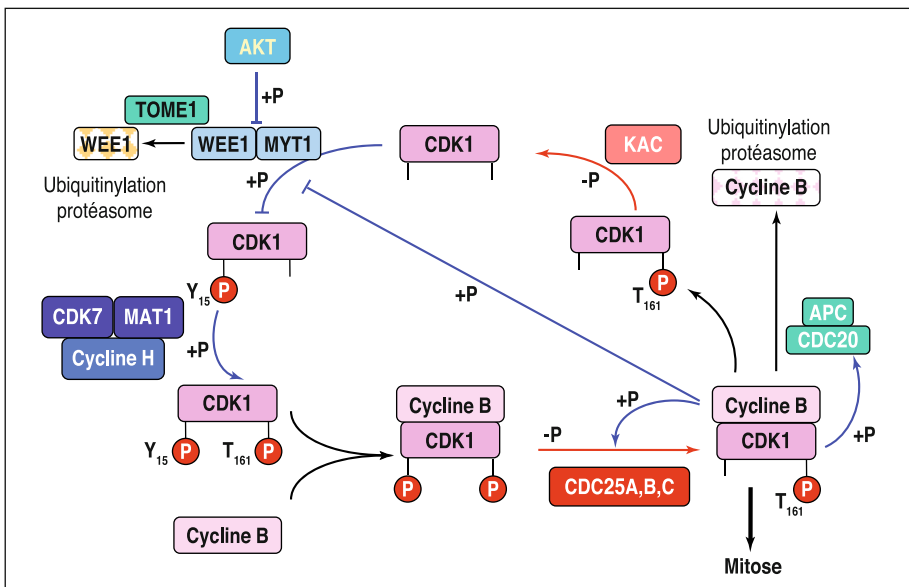


Fig. 17-4 – La transition G2 → M : activation du complexe CDK1-cycline B.

Pour être actif, ce complexe doit être phosphorylé sur la thréonine 161 et déphosphorylé sur la tyrosine 15. Il active alors sa propre déphosphorylation ainsi que sa destruction par engagement de la cycline B vers le protéasome : cela permet la présence d'un pic de concentration élevé, mais transitoire, du complexe actif, qui peut alors phosphoryler ses substrats, dont le complexe APC/C-CDC20.

Le complexe cycline B-CDK1 actif exerce une boucle de rétroaction positive par phosphorylation de la phosphatase CDC25, activant ainsi sa propre formation, et une action positive également sur le système chargé de la destruction de la cycline B en l'entraînant vers le protéasome : ce double mécanisme explique la rapidité avec laquelle la concentration du complexe actif cycline B-CDK1 atteint une valeur élevée, et la rapidité avec laquelle il disparaît en fin de mitose. Enfin, le complexe cycline B-CDK1 exerce une phosphorylation inhibitrice de la kinase WEE1, ce qui correspond également à une rétroaction positive. Pendant la durée de son existence, le complexe cycline B-CDK1 assure ainsi un grand nombre de phosphorylations des protéines effectrices de la mitose.

Nous ne décrivons ici que quelques points où s'exerce le contrôle des événements marquants de la mitose (fig. 17-5).

- *La condensation des chromosomes* est réalisée par un complexe protéique appelé condensine, activé par phosphorylation par le complexe cycline B-CDK1. Elle fait appel également à des histones dont la phosphorylation est assurée par une kinase Aurora B (AURKB).
- *La formation du fuseau achromatique* par polymérisation de dimères de tubuline ab est régulée par diverses protéines, kinésines du côté +, dynéines du côté –, elles-mêmes susceptibles d'être activées par phosphorylation. Les chromosomes s'attachent au fuseau ; ceux qui ne sont pas attachés génèrent un « signal d'attente », véritable point de contrôle, assuré par les protéines MAD2 (*Mitotic arrest deficient 2*) et BUB1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1*), qui inhibent un complexe protéique associant deux protéines, l'APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) et le CDC20.
- *La séparation des chromosomes* est assurée par inactivation de protéines nommées cohésines, due à une phosphorylation par la kinase PLK1 (elle-même activée par la kinase AURKA), et par activation d'une protéase, la séparase, activée par destruction d'une protéine qui la maintient inactive, la sécurine. Une fois le « signal d'attente » éteint, c'est le complexe APC/C-CDC20 qui conduit la sécurine vers le protéasome (Annexe C). Séparase et APC/C sont activés par phosphorylation par le complexe cycline B-CDK1.
- *La migration des chromosomes* est réalisée lorsque tous les chromosomes sont attachés par leur kinétochore au fuseau mitotique. La protéine MAD2 séquestre le CDC20 aussi longtemps qu'il reste un chromosome non attaché sur la plaque métaphasique. L'interaction MAD2-CDC20 est régulée par phosphorylation. Le complexe APC/C-CDC20 préside également à la destruction de la cycline B dans le protéasome (Annexe C), mettant ainsi fin à la mitose.

Le contrôle de l'état de l'ADN

Le cycle cellulaire contient un certain nombre de points de contrôle (*checkpoints*) qui peuvent arrêter son déroulement ; ces points de contrôle sont sous la dépendance des protéines qui surveillent la qualité de l'ADN néosynthétisé et l'absence de lésions qui conduiraient à des anomalies héréditaires (fig. 17-6). Ces protéines sont des kinases

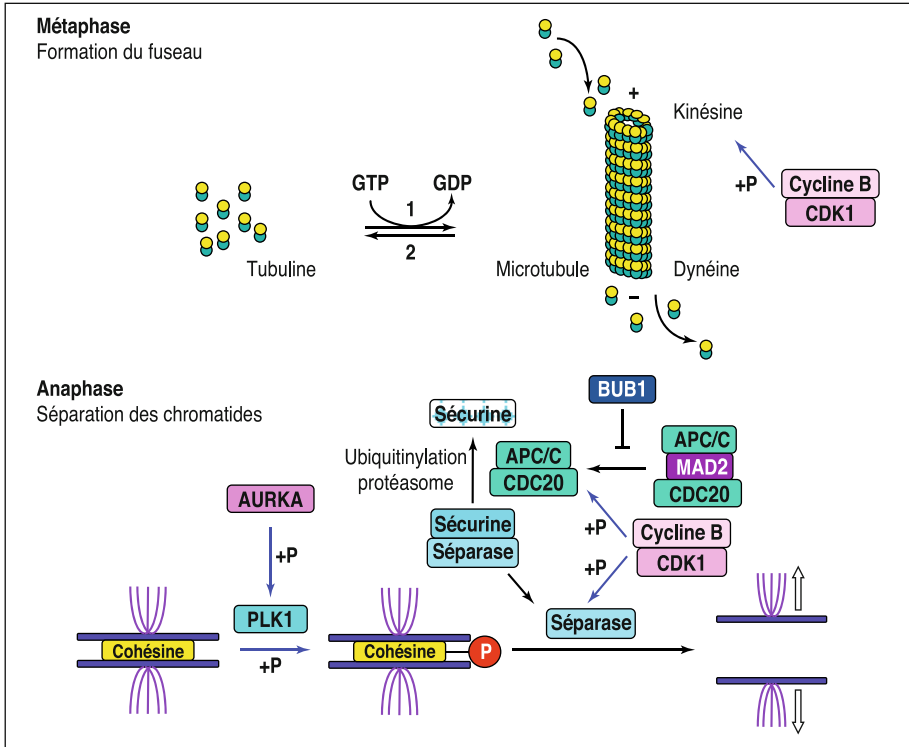


Fig. 17-5 – Deux aspects de la mitose (métaphase et anaphase).

Pour entrer en métaphase, il est nécessaire d'orienter vers la polymérisation l'équilibre tubuline-microtubule, ce qui se fait, entre autres, par la kinéchine, activée par phosphorylation par le complexe CDK1-cycline B. La séparation des chromosomes, lors de l'anaphase, est permise par l'inactivation des cohésines par phosphorylation par une kinase PLK1, et par activation d'une protéase, la séparase, réalisée par la destruction d'une protéine qui la maintient inactive, la sécourine. Le complexe APC/C-CDC20 conduit la sécourine vers le protéasome. Séparase et APC/C sont activés par phosphorylation par le complexe CDK1-cycline B.

dont l'inactivation conduit à des maladies caractéristiques de la fragilité de l'ADN : ATM (pour *Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (pour *Ataxia telangiectasia and Rad-3 related*) et la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PK). Ces trois kinases ont pour propriété d'activer par phosphorylation d'autres kinases, CHK1 et CHK2 (pour *Checkpoint kinases 1 et 2*), qui elles-mêmes inhibent par phosphorylation les phosphatases CDC25, empêchant ainsi l'activation des complexes cycline-CDK nécessaires soit à la transition $G1 \rightarrow S$ (*checkpoint G1/S*), soit au cours de la réplication (*checkpoint intra-S*), soit à la transition $G2 \rightarrow M$ (*checkpoint G2/M*). La kinase CHK2 active en outre la kinase inhibitrice WEE1, ce qui permet l'inhibition de CDK1 et maintient les cellules en phase G2. Elle inactive en revanche la kinase PLK1 et empêche ainsi la réalisation des événements précurseurs de la mitose, car PLK1 est impliquée dans la formation des centrosomes, dans la disjonction des chromosomes et dans la mise en place du fuseau mitotique.

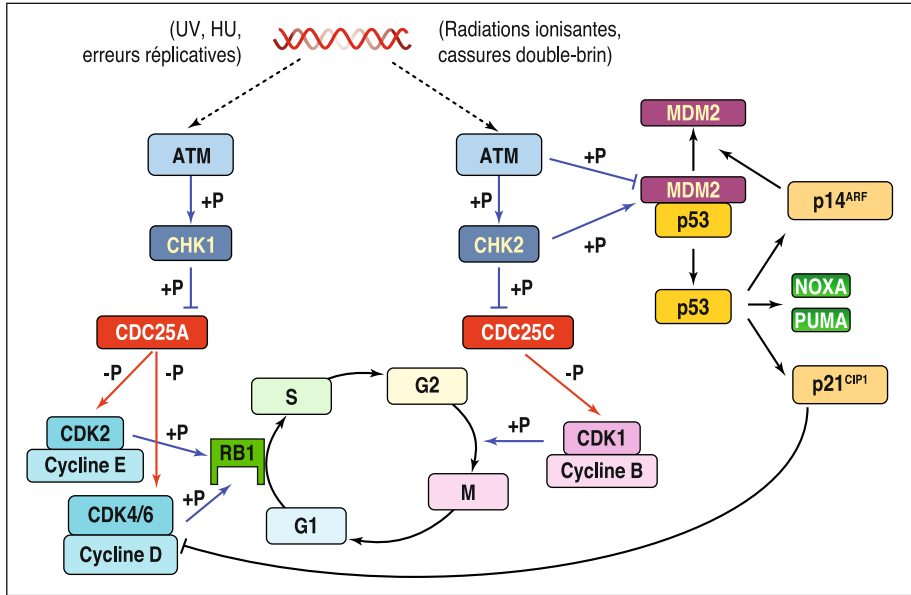


Fig. 17-6 – Les points de contrôle du cycle cellulaire et le contrôle de l'état de l'ADN.

Les kinases CHK1 et CHK2, qui empêchent l'avancement des cellules dans le cycle en inhibant par phosphorylation les phosphatases CDC25, sont activées par des kinases ATM et ATR qui contrôlent l'état de l'ADN. En outre, CHK2 phosphoryle et active p53 pendant qu'ATM libère p53 de MDM2, l'ubiquitine ligase qui l'entraîne vers le protéasome. En réponse à des dommages de l'ADN, p53, qui est un facteur de transcription, peut orienter les cellules vers l'apoptose en activant la transcription des protéines « *BH3 only* » PUMA et NOXA, ou les orienter vers un arrêt du cycle cellulaire en activant la transcription de p21, un inhibiteur des complexes CDK-cycline de la famille CIP/KIP.

La protéine CHK2 est également capable d'activer par phosphorylation le facteur de transcription p53, qui est ainsi au carrefour entre l'information reçue sur l'état de l'ADN et la mise en route de moyens visant à empêcher la propagation de lésions mutagènes. En effet, p53 est ordinairement présente à très faible concentration en raison de sa liaison avec son ubiquitine ligase, MDM2, qui l'entraîne vers le protéasome. Son activation par phosphorylation la libère de MDM2 et lui permet de jouer, après homo-tétramérisation, son rôle de facteur de transcription. Plus d'une centaine de gènes sont activables par p53 : cette protéine est capable d'induire p21^{CIP1}, que nous avons vu jouer un rôle de CKI au niveau des complexes cycline D-CDK4/6 ; elle est également capable d'induire l'apoptose, *via* les protéines pro-apoptotiques *BH3 only* que sont PUMA et NOXA (voir chapitre 18) ; elle est enfin capable, *via* p14^{ARF}, d'inhiber sa propre destruction dans le protéasome vers lequel l'entraîne MDM2. Signalons enfin que MDM2 est elle-même inactivée directement par phosphorylation par ATM, ce qui facilite la mise en œuvre de l'action de p53. MDM2 est également inactivée par un produit alternatif du gène *CDKN2A* qui code également la protéine p16^{INK4a} ; cette protéine, ARF (*Alternate reading frame*) ou p14^{ARF}, est donc sans parenté structurale avec p16^{INK4a}.

Altérations oncogéniques du contrôle du cycle cellulaire

La machinerie délicate que constitue le cycle cellulaire est susceptible de nombreuses altérations qui contribuent à une perte de son contrôle et à la formation de cancers. De nombreuses protéines de régulation de l'avancée des cellules dans le cycle peuvent se comporter, selon les cas, comme des oncogènes ou comme des gènes suppresseurs de tumeur. Sans en faire une liste exhaustive, on peut considérer comme proto-oncogènes les gènes codant pour le CDK4 et le CDK6, dont l'amplification est notée dans certains sarcomes, ou la cycline D1, dont l'expression constitutive (et non cyclique) fait suite à une translocation t(11;14) notée dans certains lymphomes. Les CDC25 apparaissent aussi comme oncogéniques, du fait de leur surexpression observée dans de nombreux cancers, et corrélée avec un mauvais pronostic. MDM2 a également un comportement d'oncogène ; on observe une amplification de son gène, située sur le même amplicon que CDK4 (chromosome 12q14-15), dans les liposarcomes et les sarcomes de l'intima des gros vaisseaux.

On peut considérer comme suppresseurs de tumeurs la protéine p16^{INK4a} et la protéine p14^{ARF}, dont le gène commun est muté ou invalidé dans de nombreuses leucémies et tumeurs solides, et les autres CKI de la famille INK4 ou de la famille CIP/KIP. La perte de fonction de la protéine RB1 est associée à de nombreux cancers. Cette protéine est un *gatekeeper* capital pour l'engagement des cellules dans la répllication de l'ADN. Ses mutations dans la lignée germinale sont caractéristiques de la forme familiale du rétinoblastome. Les protéines CHK1 et CHK2, de même que les protéines qui les activent, ATM, ATR et DNA-PK, se comportent comme des suppresseurs de tumeur de type *caretaker* en protégeant la cellule de toute reproduction intempestive lorsque existent des anomalies de l'ADN. Enfin, la protéine p53 est celle dont les mutations invalidantes sont les plus fréquentes dans les cancers humains ; les mutations de p53 se rencontrent dans près de 50 % des cancers et surviennent généralement comme un événement tardif et péjoratif de l'évolution des cancers. Ces mutations peuvent être extrêmement variées et leurs conséquences différentes selon le degré d'altération de la reconnaissance des promoteurs reconnus par p53. Entre autres effets, les mutations de p53 l'empêchent d'induire l'arrêt du cycle cellulaire (*via* p21^{CIP1}) ou l'apoptose (*via* NOXA et PUMA) en réponse à des lésions de l'ADN : l'instabilité génétique qui en résulte est un facteur d'accélération de la progression des cancers.

Il existe en définitive deux points de contrôle majeurs (*checkpoints*) de l'avancée des cellules dans le cycle ; leurs altérations oncogéniques permettent aux cellules de continuer à proliférer malgré l'existence de lésions de l'ADN qui devraient conduire à l'arrêt du cycle cellulaire :

- le passage G1/S, qui est tout particulièrement sous la dépendance des protéines INK4 ainsi que de p21^{CIP1} et p27^{KIP1}. Comme la transcription de p21^{CIP1} est sous la dépendance de p53, cette dernière apparaît comme le principal responsable de ce point de contrôle ;
- le passage G2/M qui est sous la dépendance principale des kinases WEE1 et MYT1 dont l'inhibition suffit à lever le blocage de l'entrée en mitose.

Cibles pharmacologiques

Le contrôle du cycle cellulaire est donc un élément important de régulation de la prolifération cellulaire et ses altérations contribuent à l'oncogenèse. En raison de leur rôle dans la progression des cellules dans le cycle et de leur caractère de proto-oncogènes, les CDK sont considérées comme des cibles pharmacologiques pertinentes pour le traitement des cancers et plusieurs laboratoires se consacrent à la recherche d'inhibiteurs spécifiques de leur activité kinase. Le criblage d'organismes marins a apporté une floraison de molécules intéressantes appartenant à des classes pharmacologiques variées : purines, pyrido-pyrimidines, indirubines, paullones, etc. Il est rare que ces molécules soient spécifiques d'un seul CDK, et nous avons vu que ce problème était récurrent pour les inhibiteurs de sérine/thréonine kinases. Plus d'une dizaine de molécules sont en essais cliniques.

Les CDC25 sont également une piste intéressante pour la définition de molécules antiprolifératives. Plusieurs classes pharmacologiques d'inhibiteurs de phosphatases, en particulier des dicoumarines, sont en cours d'évaluation. Les *checkpoint kinases* CHK1 et 2 peuvent être ciblées par des inhibiteurs de kinases, dans le but de sensibiliser les cellules tumorales aux agents anticancéreux provoquant des lésions de l'ADN : ceux-ci en effet provoquent une accumulation des cellules en G1 et/ou en G2 qui limite leurs effets, lorsque les points de contrôle de l'avancée des cellules dans le cycle sont fonctionnels. Dans le même ordre d'idées, le ciblage de la tyrosine kinase WEE1 pourrait se révéler intéressant, car elle contrôle de façon stricte le point de contrôle en G2. Enfin, les kinases Aurora et *Polo-like*, qui contrôlent l'exécution de phases capitales de la mitose, font l'objet de recherches intenses de molécules qui permettraient d'inhiber le déclenchement de la mitose ou le déroulement de ses phases successives.

Il est certes difficile de cibler les suppresseurs de tumeurs puisqu'il s'agirait de rétablir une fonction perdue au lieu d'inhiber une fonction catalytique excessive (kinase, phosphatase). Toutefois, un criblage à haut débit de molécules susceptibles d'inhiber la liaison MDM2-p53 a permis d'identifier une classe pharmacologique de molécules interférant avec cette liaison et stimulant les fonctions pro-apoptotiques de p53. Elles ne sont efficaces que sur les tumeurs ne présentant pas de mutation invalidante de p53.

Bien évidemment, l'exécution des programmes d'avancement des cellules dans le cycle peut également être inhibée aux différentes phases du cycle cellulaire et constituer une cible importante pour le traitement des cancers. Dans ce cas, ce sont toutes les cellules proliférantes qui sont atteintes, et pas seulement celles qui ont subi une altération oncogénique des processus de contrôle : citons les inhibiteurs de topoisomérases ou les antimétabolites, qui entravent la réplication de l'ADN (phase S) ou les poisons du fuseau qui inhibent la mitose soit en s'opposant à la formation du fuseau (vinca-alcaloïdes), soit en inhibant la dépolymérisation des microtubules (taxanes).

Bibliographie

- Atherton-Fessler S, Hannig G, Piwnica-Worms H. (1996) Regulation of Cdc2 activity by phosphorylation at T14/Y15. *Prog Cell Cycle Res*; 2: 99-105.
- Bell SP, Dutta A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*; 71: 333-74.
- Boonstra J. (2003) Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J Cell Biochem*; 90: 244-52.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*; 7: 495-507.
- Buolamwini JK. (2000) Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr Pharm Design*; 6: 379-92.
- Chen HZ, Tsai SY, Leone G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer*; 9: 785-97.
- Dasika GK, Lin SC, Zhao S *et al.* (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*; 18: 7883-99.
- Doree M, Galas S. (1994) The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J*; 8: 1114-21.
- Fisher RP. (2005) Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *J Cell Sci*; 118: 5171-80.
- Grana X, Garriga J, Mayol X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene*; 17: 3365-83.
- Hayles J, Nurse P. (1989) A review of mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res*; 184: 273-86.
- Jones SM, Kazlauskas A. (2001) Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Chem Rev*; 101: 2413-23.
- Kaldis P. (2007) Another piece of the p27Kip1 puzzle. *Cell*; 128: 241-4.
- Malumbres M, Barbacid M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer*; 1: 222-31.
- Masui Y. (1992) towards understanding the control of the division cycle in animal cells. *Biochem Cell Biol*; 70: 920-45.
- Nilsson I, Hoffmann I. (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res*; 4: 107-14.
- Obaya AJ, Sedivy JM. (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*; 59: 126-42.
- O'Connor MJ, Martin NM, Smith EC. (2007) Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene*; 26: 7816-24.
- Peters JM. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*; 9: 931-43.
- Prosperi E, Stivala LA, Scovassi AI, Bianchi L. (1997) Cyclins: relevance of subcellular localization in cell cycle control. *Eur J Histochem*; 41: 161-8.
- Stark GR, Taylor WR. (2006) Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol*; 32: 227-48.
- Taylor WR, Stark GR. (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*; 20: 1803-15.
- Vidal A, Koff A. (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene*; 247: 1-15.

Chapitre 18

Les voies de contrôle de l'apoptose

Introduction

L'apoptose constitue une des modalités les plus importantes de mort cellulaire, si importante qu'elle a éclipsé toutes les autres que l'on commence seulement à redécouvrir. L'apoptose est une mort cellulaire programmée, active, mise en œuvre en réponse à des signaux d'origine intracellulaire (lésions de l'ADN, anomalies de la mitose, stress oxydatif) ou extracellulaires (messages de mort provenant d'autres cellules) et aboutissant à l'activation de protéases capables d'hydrolyser les constituants cellulaires, les caspases. L'apoptose joue une multitude de rôles physiologiques fondamentaux lors de l'embryogenèse et dans l'homéostasie tissulaire : pour ne citer qu'un seul exemple, elle est responsable de l'involution du thymus lors du passage de l'enfance à l'âge adulte. On a fait de l'apoptose la voie de passage obligée de l'action des agents cytotoxiques, même si elle est souvent dans ce cas une conséquence phénotypique secondaire à des mécanismes d'actions ne la concernant qu'indirectement. On l'oppose souvent à la nécrose, alors que d'autres points d'opposition et de comparaison sont également à chercher du côté de la sénescence ou de la mort mitotique.

Nous présenterons dans ce chapitre les voies de signalisation qui aboutissent à l'exécution du programme de mort cellulaire par apoptose, mais nous ne décrirons pas les techniques qui permettent de détecter ou de quantifier l'apoptose pas plus que nous ne décrirons les modalités d'exécution du programme d'apoptose. Dans un premier temps, nous présenterons quelques éléments essentiels concernant les protéines impliquées dans le programme apoptotique, en remontant le cours des événements successifs. Nous évoquerons ensuite les messages intracellulaires qui, à partir de lésions ou de stress divers, aboutissent à la mise en œuvre de l'apoptose. Enfin, nous présenterons les messages extracellulaires aboutissant à la même conclusion ; nous n'avons pas fait de chapitre particulier pour les systèmes ligand-récepteur impliqués dans l'apoptose comme nous l'avons fait pour tous les autres systèmes.

Les protéines impliquées dans la mise en œuvre de l'apoptose

Les caspases

Les caspases sont les enzymes effectrices de l'apoptose ; ce sont des protéases caractérisées par la présence d'une cystéine au niveau de leur site actif et leur capacité d'hydrolyser des chaînes polypeptidiques au niveau d'un acide aspartique, ce qui est à l'origine de leur nom. Certaines, dites de classe I, sont capables d'activer par protéolyse des cytokines comme l'interleukine (IL1) (chapitre 12) ; d'autres, de classe II, sont les caspases effectrices de l'apoptose, qui hydrolysent les protéines cellulaires, et dont la mieux connue est la caspase 3 ; les caspases de classe III (caspases 8 et 9) sont des caspases initiateurs, activatrices des caspases de classe II.

L'activation de protéines par protéolyse ménagée est un des mécanismes fondamentaux de la régulation post-traductionnelle de l'activité des protéines (Annexe C). Les protéines cellulaires doivent être protégées en temps normal de ces enzymes protéolytiques : ces dernières existeront donc sous une forme inactive (procaspase dans le cas des caspases), qui sera elle-même activée par protéolyse ménagée. Il faudra bien sûr un événement initiateur particulier pour mettre en œuvre la première activité protéolytique de la cascade. Dans le cas de l'apoptose, cet événement consiste en la formation d'édifices supramoléculaires transitoires, véritables « plates-formes » permettant de disposer les procaspases dans l'espace, grâce à des protéines adaptatrices, de telle sorte qu'elles pourront s'hydrolyser, et par conséquent s'activer, mutuellement.

De façon générale, l'activation des caspases effectrices fait intervenir une procaspase initiateur, des protéines adaptatrices leur permettant de s'organiser au niveau d'une « plate-forme », et les procaspases effectrices en instance d'activation par protéolyse. Dans le cas de la voie de l'apoptose intrinsèque, la procaspase initiateur est la procaspase 9 et la plate-forme d'activation se nomme apoptosome ; dans le cas de l'apoptose déclenchée par un signal extracellulaire, la procaspase initiateur est une procaspase 8 et la plate-forme se nomme DISC (*Death-inducing signalling complex*). L'activation d'une procaspase en caspase fait intervenir l'élimination d'un prodomaine N-terminal, la coupure d'un domaine C-terminal qui reste lié à la caspase par liaison non covalente et la dimérisation de deux molécules de caspase ainsi remaniées (fig. 18-1). Procaspases initiateurs et effectrices diffèrent par la nature des domaines N- et C-terminaux ; les procaspases initiateurs possèdent en particulier dans leur partie N-terminale des domaines de reconnaissance appelés CARD (*Caspase recruitment domain*) ou DED (*Death effector domain*) selon les cas. Toutes les caspases conservent la même séquence polypeptidique au niveau de leur site actif (QACXG) et leur capacité, une fois activées et dimérisées, de cliver une chaîne polypeptidique immédiatement en aval d'un acide aspartique. La figure 18-2 présente les deux étapes d'activation d'une procaspase initiateur en caspase et d'une procaspase effectrice en caspase, et l'intervention ultime d'une caspase effectrice activée sur une protéine cible.

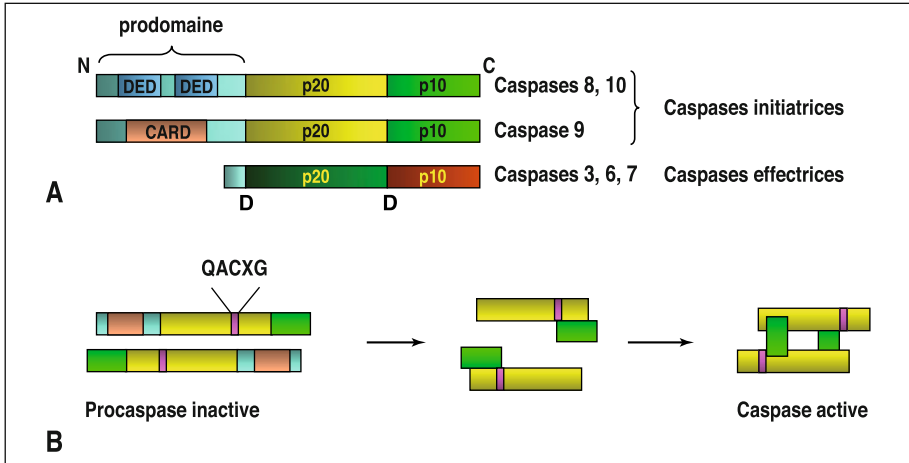


Fig. 18-1 – Les caspases et leur activation.

A. Structure générale des caspases. Toutes les procaspases possèdent deux domaines, p20 et p10, dont le clivage au niveau d'un acide aspartique D permet le passage à une conformation active. Elles possèdent également un prodomaine dont l'élimination est nécessaire pour l'activité. Les procaspases initiatrices possèdent un prodomaine long, porteur de domaines de reconnaissance DED (caspases 8 et 10) ou CARD (caspase 9).

B. Activation des caspases. L'exemple choisi est celui de la caspase 9 (caspase initiatrice). Le site catalytique responsable des clivages est caractérisé par la séquence QACXG. La disposition dans l'espace de deux molécules de procaspase permet le clivage protéolytique d'une molécule par l'autre au niveau des aspartates D. Après élimination du prodomaine, la redistribution des domaines p10 et p20 et la dimérisation de l'ensemble permettent la génération d'une caspase active.

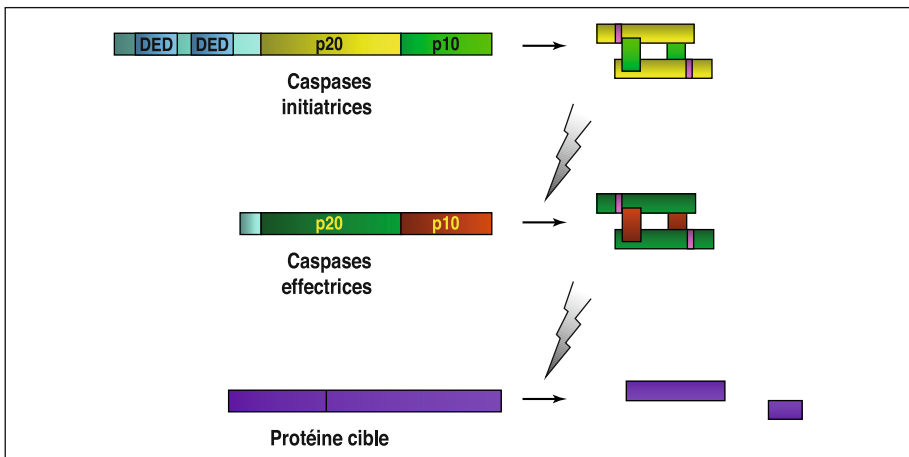


Fig. 18-2 – La cascade protéolytique des caspases.

Une caspase initiatrice (ici la caspase 8, pourvue de deux domaines DED de reconnaissance des protéines adaptatrices FADD ou TRADD), activée elle-même de façon autocatalytique, active par clivage au niveau de deux aspartates une procaspase effectrice. Cette dernière, après dimérisation, devient active et peut cliver des protéines cellulaires diverses, toujours au niveau d'un aspartate.

Les protéines de la famille BCL2

Les protéines de la famille BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) constituent en fait une famille assez hétérogène d'une vingtaine de protéines qui sont soit mitochondriales, soit capables de s'associer à la mitochondrie lors d'un processus d'activation. Elles présentent des homologies de structure qui les font ranger dans la même famille, mais leurs fonctions peuvent être très différentes et il est nécessaire de distinguer des sous-familles. Elles sont caractérisées par la présence de domaines caractéristiques appelés domaines BH (*BCL2 homology domains*). Les plus « complètes » possèdent quatre domaines (BH1 à BH4) et un domaine transmembranaire C-terminal qui leur permet de s'insérer dans la membrane externe de la mitochondrie. Les domaines BH1 et BH2 sont impliqués dans la régulation de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ; le domaine BH3, en association avec les domaines BH1 et BH2, est un domaine d'interaction protéine-protéine qui permet leur homo- ou leur hétéro-dimérisation ; le domaine BH4, N-terminal et essentiellement intracytoplasmique, est un domaine d'interaction avec une protéine adaptatrice cytoplasmique, APAF1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*). Les sous-familles de protéines BCL2 sont les suivantes (fig. 18-3) :

- protéines à quatre domaines BH et avec domaine transmembranaire : BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1 (*Myeloid cell leukemia sequence 1*), BCLA1, BCL-RAMBO ; ces protéines sont anti-apoptotiques ;
- protéines à trois domaines BH et avec domaine transmembranaire : BAX (*BCL2-associated X protein*), BAK (*BCL2 homologous antagonist/killer*) et BOK (*BCL2-related ovarian killer*) ; ces protéines sont pro-apoptotiques ;
- protéines à seul domaine BH3 (*BH3-only proteins*), qui sont pro-apoptotiques et qui peuvent avoir un domaine transmembranaire : BIK (*BCL2-interacting killer*), HRK (*Harakiri BCL2-interacting protein*) ; ou pas de domaine transmembranaire : BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*), BID (*BH3 domain interacting death agonist*), BIM (*BCL2-interacting mediator of cell death*), également appelée BOD (*BCL2-related ovarian death agonist*), BMF (*BCL2 modifying factor*), NOXA, PUMA (*p53-upregulated mediator of apoptosis*).

Nous décrirons dans le paragraphe consacré à la voie de l'apoptose intrinsèque les mécanismes par lesquels ces protéines sont engagées dans le contrôle du déclenchement de l'apoptose.

Les protéines de la famille IAP

Les protéines IAP (*Inhibitor of apoptosis protein*) ou protéines BIRC (*Baculovirus IAP repeat containing proteins*) constituent un ensemble de huit protéines cytoplasmiques inhibitrices des caspases. Ces protéines possèdent un ensemble de domaines caractéristiques (fig. 18-4). Certains domaines sont constants, les domaines BIR1 à BIR3 (*Baculovirus IAP repeat*) permettant des interactions protéine-protéine, en particulier avec les caspases 3 et 9. D'autres sont inconstants, les domaines CARD ou DED qui permettent leur interaction avec les caspases initiateurs ou avec des protéines adap-

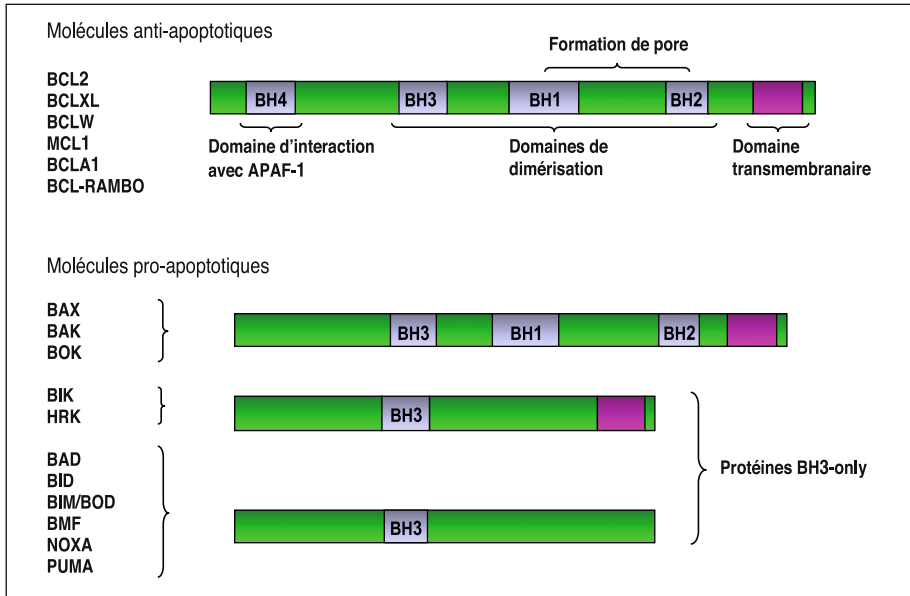


Fig. 18-3 – Les protéines de la famille BCL2.

Ces protéines, dont quelques-unes seulement sont représentées ici, peuvent posséder un domaine transmembranaire et jusqu'à quatre domaines particuliers, impliqués dans la dimérisation (domaines BH1, BH2 et BH3), dans la régulation de l'ouverture du pore de transition mitochondrial (domaines BH1 et BH2) et dans l'interaction avec une séquence de la protéine APAF1 (BH4). Les protéines anti-apoptotiques dont le type est BCL2 sont insérées dans la membrane externe de la mitochondrie par leur extrémité N-terminale et immobilisent la protéine APAF1 par leur extrémité C-terminale. Certaines molécules pro-apoptotiques dont l'archétype est BAX ont un domaine transmembranaire et des domaines de dimérisation et d'interaction protéine-protéine. D'autres molécules pro-apoptotiques ne sont pas insérées dans la membrane mitochondriale (elles n'ont pas de domaine transmembranaire), mais ont un tropisme mitochondrial permis par leur domaine BH3 (protéines *BH3 only*) qui peut interagir avec les domaines correspondants des autres protéines de la famille BCL2.

tatrices, et le domaine RING (*Really interesting new gene*) qui porte une fonction d'E3 ligase pour les caspases, les entraînant vers le protéasome et ajoutant ainsi leur destruction à leur inhibition (voir Annexe C). En addition à leur action inhibitrice de l'apoptose, ces protéines jouent un rôle dans la cytodierèse en fin de mitose et dans la régulation de la voie de signalisation NFκB (voir chapitre 12).

La plupart de ces protéines sont elles-mêmes inhibées par une protéine d'origine mitochondriale, SMAC-DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase-Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*). Cette protéine agit sous forme de dimère et se lie aux domaines BIR3 des IAP pour les inhiber en les empêchant de se lier avec les caspases.

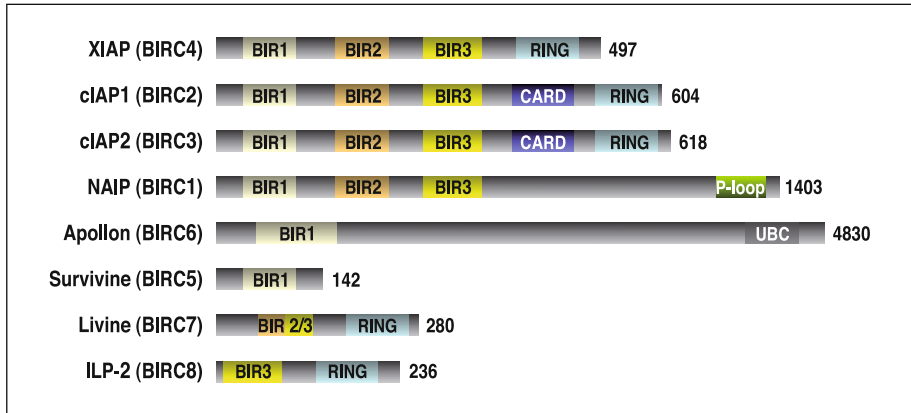


Fig. 18-4 – Les protéines de la famille IAP.

Un total de huit molécules de cette famille est rencontré dans le cytoplasme. Ce sont des inhibiteurs des caspases. Les molécules possèdent divers domaines de reconnaissance, en particulier un domaine CARD qui leur permet d'interagir avec les caspases, des domaines BIR et un domaine RING permettant leur liaison avec l'ubiquitine.

Les protéines de la famille des récepteurs de mort et leurs ligands

Les messages extracellulaires de mort cellulaire sont apportés par des ligands qui reconnaissent des récepteurs membranaires de la cellule cible. Ligands et récepteurs appartiennent respectivement à la superfamille des TNF (TNFSF) et à la superfamille des récepteurs de TNF (TNFRSF). Les ligands sont au nombre d'une vingtaine, parmi lesquels nous retiendrons trois qui sont impliqués dans la transmission de messages de mort cellulaire : FASL ou FASLG (FAS ligand), TNF (*Tumor necrosis factor*) et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Les récepteurs sont au nombre de 29 et nous ne retiendrons que ceux qui intègrent les signaux apportés par les messages pro-apoptotiques. Les ligands et récepteurs qui ne sont pas évoqués ici véhiculent une signalisation relevant de l'immunité et de l'inflammation. Les récepteurs possèdent un domaine extracellulaire de reconnaissance du ligand et un domaine intracellulaire effecteur de la signalisation. On peut les ranger en trois familles selon la présence de domaines cytoplasmiques de reconnaissance protéine-protéine (fig. 18-5) :

- les récepteurs possédant un domaine DD (*Death domain*) qui leur permet d'interagir avec une protéine adaptatrice dotée d'un domaine homologue ; parmi ces récepteurs, on trouve FAS (*Fragment for apoptosis stimulation*), TRAILR1 et TRAILR2, qui tous trois reconnaissent la protéine adaptatrice FADD (*FAS-associated death domain protein*) et TNFR1, qui reconnaît la protéine adaptatrice TRADD (*TNF-receptor associated death domain protein*). Ces protéines adaptatrices sont à l'origine de l'activation d'une caspase initiateur, la caspase 8. D'autres récep-

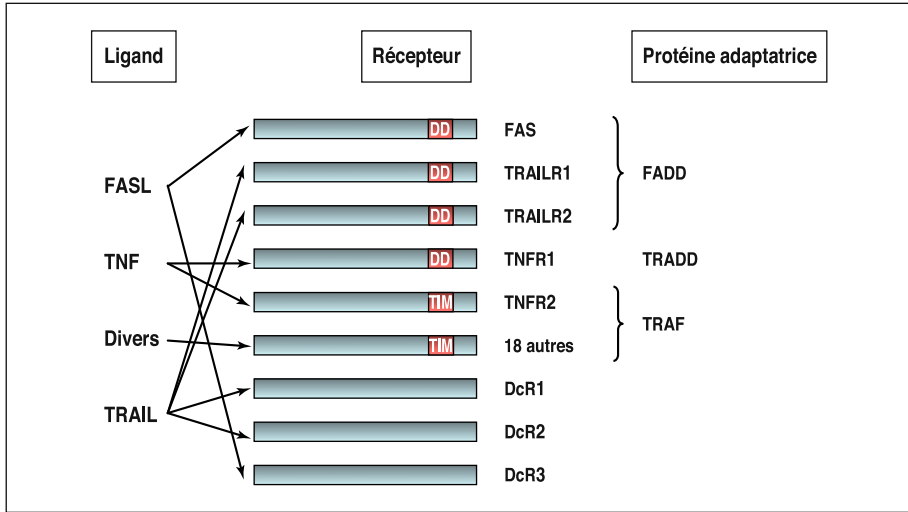


Fig. 18-5 – Les récepteurs de mort cellulaire, leurs ligands et les protéines adaptatrices. Les ligands de la superfamille des TNF (FASL, TNF, TRAIL et autres ligands) reconnaissent les récepteurs de la superfamille du TNR (FAS, TNFR1 et R2, TRAILR1 et R2), ainsi que des récepteurs leurres (DcR) dépourvus de domaines de liaison avec une protéine adaptatrice.

- teurs possèdent un domaine de mort et sont impliqués dans l'apoptose : DR3, DR6, NGFR (*Nerve cell growth factor receptor*) et EDAR (*Ectodysplasin A receptor*) ; les ligands spécifiques des deux premiers sont incertains, celui de NGFR est le NGF et celui de EDAR l'ectodysplasine (EDA). La protéine adaptatrice du récepteur EDAR se nomme EDARADD, par analogie avec les protéines FADD et TRADD ;
- les récepteurs possédant un motif TIM (*TRAF-interacting motif*) qui reconnaît un autre type de protéine adaptatrice, TRAF (*TNF receptor-associated factor*), à l'origine de l'activation de voies de signalisation aboutissant au facteur de transcription NFκB (chapitre 12), à la voie ERK et à la voie JNK (chapitre 2). Ces récepteurs sont nombreux et nous n'évoquerons ici que le récepteur TNFR2, les autres étant impliqués dans l'immunité et l'inflammation ;
 - les récepteurs ne contenant aucun domaine de reconnaissance et ne transmettant aucun message. Ce sont des récepteurs leurres (*Decoy receptors*), DcR1, DcR2 et DcR3, qui vont en fait bloquer le signal apporté par un ligand, FASL pour DcR3, TRAIL pour DcR1 et DcR2.

Nous décrirons dans le paragraphe consacré à la voie de l'apoptose extrinsèque les mécanismes par lesquels ces protéines sont engagées dans le déclenchement de l'apoptose. Il existe par ailleurs un certain nombre de protéines possédant des domaines d'interaction avec les récepteurs de mort et/ou avec les protéines adaptatrices FADD et TRADD. Certaines sont des caspases ou des protéines IAP ; les autres seront décrites avec l'apoptose extrinsèque.

La voie de l'apoptose intrinsèque (mitochondriale)

La mise en œuvre de l'apoptose intrinsèque dépend de l'émission de signaux qui sont envoyés à la mitochondrie qui les intègre et met en œuvre une réponse aboutissant à l'activation d'une caspase initiateur, la caspase 9, d'où découle l'activation de caspases effectrices 3 et 7 (fig. 18-6). Ces signaux sont constitués par de petites protéines de la famille BCL2, les protéines *BH3-only*, dont la synthèse est mise en route par des facteurs de transcription activés par divers dommages cellulaires. C'est ainsi que l'endommagement de l'ADN, qui permet l'activation de p53 (voir chapitre 17), aboutit à la transcription des protéines NOXA et PUMA. De même, l'endommagement des microtubules aboutit à la transcription des protéines BIM et HRK. Par ailleurs, certains messages extracellulaires peuvent jouer directement sur d'autres protéines *BH3-only* : c'est le cas des facteurs de croissance qui permettent la phosphorylation et l'inactivation de BAD par AKT (voir chapitre 3), et des messages de mort cellulaire qui permettent la protéolyse et l'activation de BID (voir le paragraphe suivant).

Les protéines *BH3-only* sont capables, par l'intermédiaire de leur domaine BH3, d'interagir au niveau de la mitochondrie avec d'autres protéines de la famille BCL2 dotées, elles, de domaines transmembranaires permettant leur insertion mitochondriale. Les protéines BCL2 interagissant entre elles, contrôlent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK sont capables de s'oligomériser pour former des canaux transmembranaires au niveau de la membrane externe, ou en provoquant sa perméabilisation par des interactions protéines-lipides. Les mécanismes exacts selon lesquels les protéines anti-apoptotiques (type BCL2) et pro-apoptotiques (type BAX) contrôlent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ne sont pas entièrement compris et font l'objet de controverses.

La « théorie du rhéostat » se fonde sur l'existence d'un équilibre entre les deux types de protéines reposant sur leur homo- ou hétéro-dimérisation. Dans ce scénario, l'abondance de protéines de type BCL2 privilégie les dimères BCL2-BCL2 et empêche la perméabilisation, l'abondance de protéines de type BAX privilégie les dimères BAX-BAX et promeut la perméabilisation mitochondriale, les protéines *BH3-only* venant interagir avec les domaines correspondants de BCL2 ou de BAX pour favoriser telle ou telle dimérisation. Toutes les protéines *BH3-only* n'auraient pas le même effet d'activateur direct de BAX et BAK ou de répresseur des protéines de types BCL2. Il existe une certaine spécificité de l'action des protéines *BH3-only* : BID, BIM et PUMA interagissent avec toutes les protéines de type BCL2, alors que BAD n'interagit qu'avec BCL2, BCLXL et BCLW, et NOXA avec BCLA1 et MCL1. Cette spécificité permettrait une réponse adaptée en fonction du contexte cellulaire.

Il existe toutefois des hypothèses alternatives expliquant la perméabilisation mitochondriale qui font appel à la régulation de l'ouverture et de la fermeture du pore de transition mitochondrial. Ce dernier est un complexe protéique encore hypothétique formant un canal qui traverse les membranes interne et externe de la mitochondrie et mettant en contact de façon transitoire la matrice mitochondriale et le cytoplasme. Il est composé de plusieurs protéines, parmi lesquelles deux transporteurs trans-

membranaires venant au contact, VDAC (*Voltage-dependent anion channel*) au niveau de la membrane externe, ANT (*Adenine nucleotide translocator*) au niveau de la membrane interne. L'intervention du PTP dans la perméabilisation mitochondriale lors de l'apoptose semble être un mécanisme mis en jeu uniquement dans des contextes particuliers (stress oxydatif, altérations de l'homéostasie calcique), car de façon générale, la membrane interne ne joue aucun rôle dans la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

Quelle que soit la séquence des événements aboutissant à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, celle-ci permet la sortie, à partir de l'espace intermembranaire, de plusieurs protéines, que l'on a nommées de façon générique des AIF (*Apoptosis-inducing factors*) (fig. 18-6). Parmi elles figure en premier lieu le cytochrome *c*, le transporteur d'électrons de la chaîne mitochondriale. La sortie du cytochrome *c* de la mitochondrie constitue l'événement déclenchant de l'apoptose. Le cytochrome *c* préside à l'organisation, dans le cytoplasme, d'une « plate-forme » qui permet l'activation de molécules de procaspase 9 en caspase 9 active par protéolyse, selon un mécanisme autocatalytique. Cette plate-forme, l'apoptosome (fig. 18-7), véritable organelle cytoplasmique transitoire, est bâtie selon une symétrie d'ordre 7 et associe sept molécules de cytochrome *c*, sept molécules d'une protéine intracytoplasmique nommée APAF1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*), sept molécules de dATP et sept molécules de procaspase 9. Cet édifice supramoléculaire permet de placer les molécules de procaspase 9 dans une disposition telle qu'elles peuvent se cliver mutuellement et donner naissance à la caspase 9 active, qui pourra alors activer la procaspase 3 en caspase 3 comme nous l'avons vu plus haut.

Un deuxième facteur capable de sortir de la mitochondrie lors de l'ouverture du pore de transition mitochondrial est la protéine SMAC-DIABLO (voir p. 219). Cette protéine est un inhibiteur des protéines inhibitrices des caspases ; elle vient renforcer

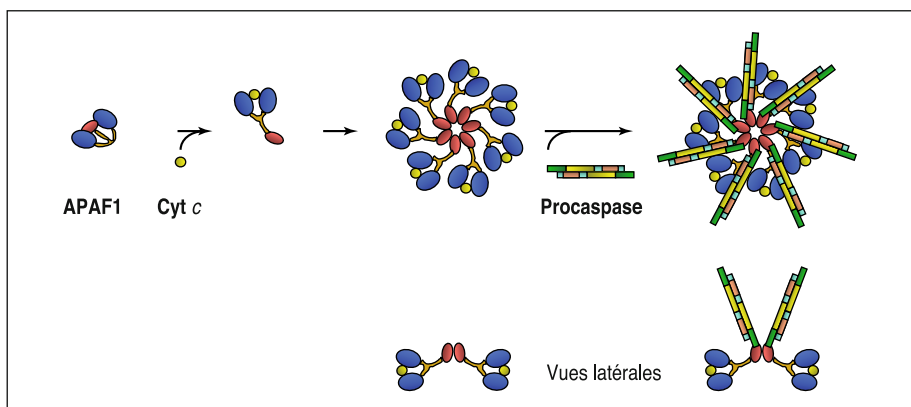


Fig. 18-6 – Formation et activation de l'apoptosome.

La protéine APAF1, repliée à l'état basal, est capable, en présence du cytochrome *c*, de changer de conformation et de former un heptamère, l'apoptosome. Ses domaines CARD, au cœur de l'apoptosome, peuvent interagir avec les domaines correspondants de la caspase 9, ce qui permet son activation autocatalytique.

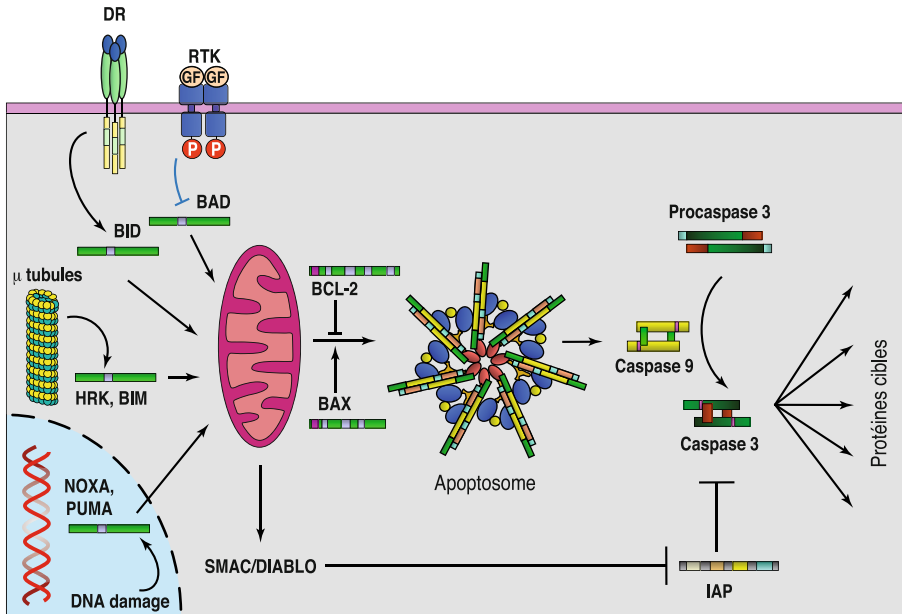


Fig. 18-7 – La voie de l'apoptose intrinsèque (mitochondriale).

Divers signaux induits par des stress intracellulaires ou d'origine extracellulaire sont apportés à la mitochondrie par des protéines *BH3 only* et interagissent avec les protéines mitochondriales de la famille BCL2, en favorisant l'ouverture du pore de transition. La sortie du cytochrome *c* de la mitochondrie lui permet d'interagir avec la protéine APAF1, de permettre son heptamérisation en apoptosome et de recruter les molécules de procaspase 9. Ces dernières vont s'activer en caspase 9 par protéolyse selon un processus autocatalytique et activer à leur tour la procaspase 3 en caspase 3 par protéolyse. La caspase 3 pourra alors détruire ses protéines cibles.

l'action de l'induction de l'apoptose assurée par le cytochrome *c* en inhibant les protéines exécutrices du programme de mort cellulaire, les caspases effectrices. D'autres protéines AIF sont susceptibles d'être relarguées par la mitochondrie lors de la perméabilisation de la membrane externe, comme la protéine HTRA2 (*High temperature requirement protein A2*). Enfin, certaines formes radicalaires de l'oxygène appelées ROS (*Reactive oxygen species*) sont susceptibles de quitter la mitochondrie *via* le pore de transition mitochondrial. Ce sont l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical OH^{\bullet} et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces formes toxiques produites à partir de l'oxygène moléculaire de la chaîne de transport des électrons, génèrent un stress oxydatif dans la cellule (voir chapitre 16).

La voie de l'apoptose extrinsèque (dite des récepteurs de mort)

Les différents ligands inducteurs d'apoptose, que nous avons décrits p.220, sont susceptibles de reconnaître des récepteurs spécifiques selon une combinatoire présentée figure 18-5. Les ligands sont des protéines transmembranaires trimériques dont l'extrémité C-terminale est exposée vers l'extérieur de la cellule ; cette partie peut être clivée pour donner une forme soluble. Comme nous l'avons vu, les récepteurs possèdent des domaines de reconnaissance qui permettent la transduction d'un message. Toutefois, certains des récepteurs sont des récepteurs leurres (*Decoy receptors*) qui sont incapables de transmettre un message de mort cellulaire ; ils vont mobiliser les messages de mort sans les exécuter et se comporter par conséquent de façon opposée à l'apoptose. La régulation de l'expression relative des vrais et des faux récepteurs module le message de mort apporté par les différents ligands.

La liaison d'un ligand sur un récepteur induit la trimérisation de ce dernier. Toutefois, certains récepteurs sont préassociés en oligomères grâce à des domaines PLAD (*Pre-ligand assembly domain*), de sorte que le ligand n'induit pas réellement dans ce cas la trimérisation, mais plutôt la stabilise. Le mécanisme de cette trimérisation est comparable au mécanisme de dimérisation induit par les facteurs de croissance sur leurs récepteurs. La trimérisation des récepteurs permet la reconnaissance homotypique de leurs domaines DD par les domaines correspondants de protéines adaptatrices, FADD ou TRADD. Les protéines adaptatrices possèdent en outre des domaines DED (*Death effector domain*). Les domaines DED des protéines adaptatrices sont eux-mêmes reconnus par les domaines correspondants de la procaspase 8. Il se forme alors un édifice supramoléculaire, plate-forme appelée DISC (*Death-inducing signalling complex*), qui va jouer, à proximité de la membrane plasmique, le rôle que joue l'apoptosome à proximité de la mitochondrie (fig. 18-8). Ces édifices semblent en outre s'associer entre eux au niveau des *rafts* de la membrane plasmique pour former des macro-agrégats.

La caspase 8, dans certains types cellulaires, va activer non seulement la procaspase 3 en caspase active pour exécuter le programme d'apoptose, mais aussi une protéine *BH3-only*, la protéine BID, que l'on appelle t-BID après qu'elle a été tronquée. Comme ses homologues (voir p. 218), cette protéine va interagir avec les protéines BCL2 et stimuler la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pour la sortie du cytochrome *c* ; cette interconnexion entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque de l'apoptose exerce un effet d'amplification des messages de mort. Les cellules qui l'utilisent sont parfois appelées « cellules de type II » par rapport aux « cellules de type I » qui ne l'utilisent pas.

Outre la partie intracellulaire du récepteur, la protéine adaptatrice et la caspase initiatrice, un quatrième partenaire intervient dans la composition du DISC : la protéine FLIP (*FADD-like inhibitory protein*) ou CFLAR (*Caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator*). Cette protéine existe sous une forme longue, avec des domaines DED en N-terminal et une structure analogue à la caspase 8 en C-terminal (mais sans

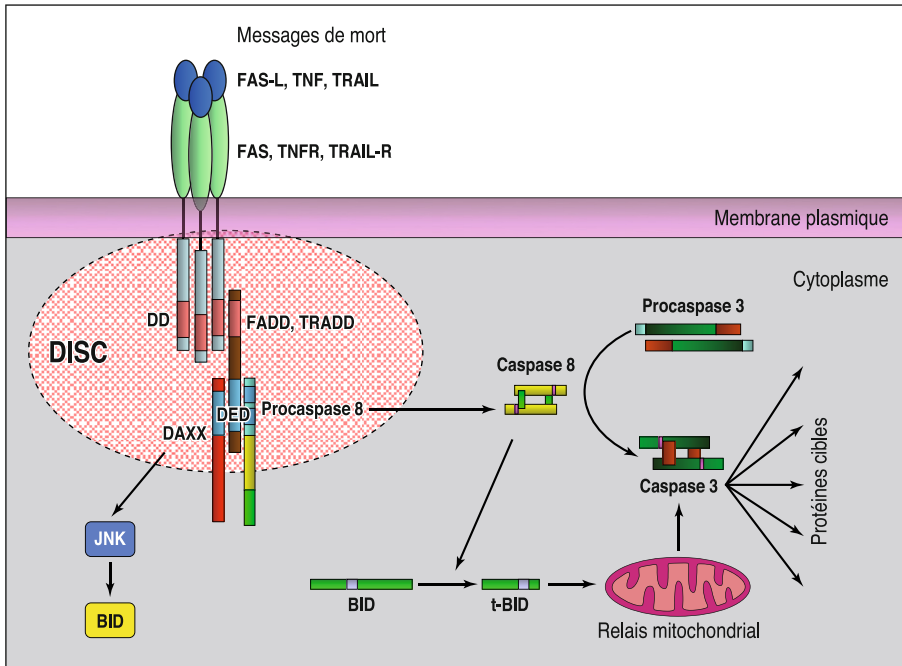


Fig. 18-8 – La voie de l'apoptose extrinsèque.

Divers signaux apportés par des ligands de mort cellulaire (FASL, TNF, TRAIL) activent des récepteurs membranaires (FAS, TNFR, TRAILR) en provoquant leur trimérisation. La partie cytoplasmique de ces récepteurs contient un domaine DD qui leur permet de recruter une protéine adaptatrice (FADD, TRADD) pourvue d'un domaine analogue ainsi que d'un domaine DED. Des molécules de caspase 8, pourvues elles aussi de domaines DED, sont alors recrutées pour constituer, avec le récepteur trimérisé et les protéines adaptatrices, un édifice supramoléculaire, le DISC. La caspase 8, activée par protéolyse selon un processus autocatalytique, est alors capable d'activer la procaspase 3 en caspase 3 par protéolyse, cette dernière pouvant alors détruire ses protéines cibles. La caspase 8 est également capable, dans certaines cellules, d'activer par protéolyse la protéine BID (protéine de type *BH3 only*) qui, sous sa forme tronquée t-BID, agira au niveau de la mitochondrie pour favoriser l'ouverture du pore de transition, amplifiant ainsi le message apoptotique intrinsèque.

la cystéine catalytique) et sous une forme tronquée du côté C-terminal, le clivage étant assuré par la caspase 8. Cette protéine semble jouer un rôle double, facilitant l'apoptose à faible concentration et l'inhibant à forte concentration, par compétition avec la caspase 8 et par activation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération.

L'activation d'une caspase initiatrice et la mise en œuvre de l'apoptose n'est pas, en effet, la seule conséquence de l'activation d'un récepteur de mort par un ligand. Les domaines DD des récepteurs et les domaines DED des protéines adaptatrices et de FLIP peuvent être reconnus par des protéines diverses impliquées dans la transmission de signaux. Certains récepteurs, comme le TNFR2 (voir p. 221), ne possèdent

d'ailleurs pas de domaine DD, mais seulement un domaine TIM qui est directement reconnu par de telles protéines. Les voies activées par ces protéines peuvent être des voies de prolifération et des voies d'apoptose, montrant le double rôle que peuvent jouer les récepteurs de type TNFRSF (fig. 18-9) ; elles sont d'ailleurs plus impliquées dans la signalisation de l'immunité et de l'inflammation que dans celle de la prolifération et de la mort cellulaires :

- les protéines TRAF (*TNF receptor-associated factor*), qui ne possèdent pas de domaine DD ou DED, permettent l'activation de la voie NFκB *via* l'activation de la protéine IKK (*Inhibitor of NFκB kinase*) (voir chapitre 12), ces voies étant également activées directement par FLIP après son clivage. Rappelons que NFκB est un facteur de transcription impliqué dans la survie et la prolifération et s'opposant donc à l'apoptose;

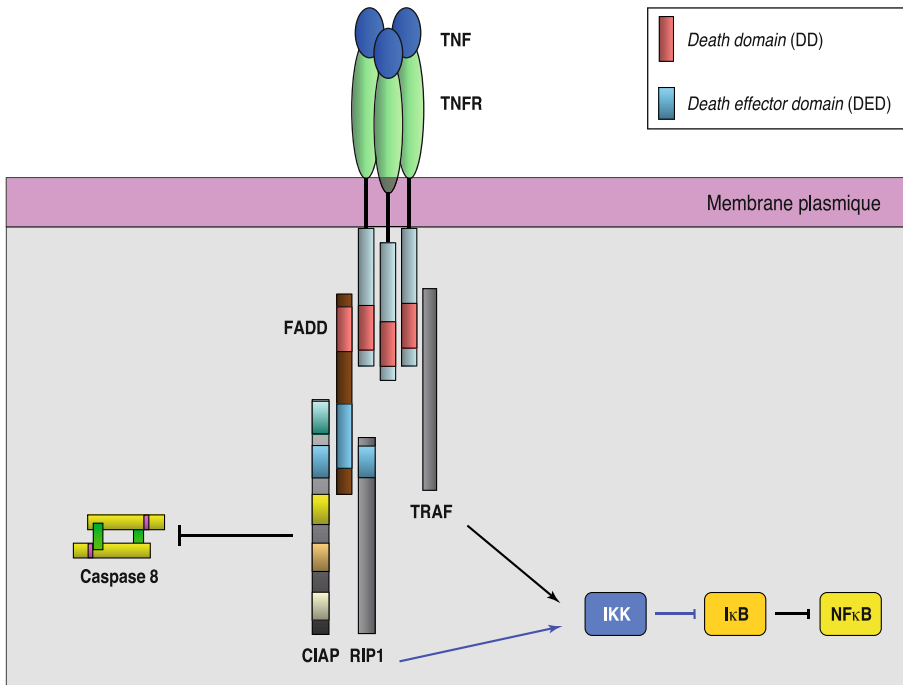


Fig. 18-9 – Voies de signalisation induites par les récepteurs du TNF.

Certaines protéines adaptatrices comme RIP1 ou TRAF sont capables de s'opposer à l'apoptose en activant la voie du NFκB. RIP1 est une kinase qui reconnaît les domaines DED, alors que TRAF interagit avec les récepteurs même s'ils sont dépourvus de domaine DD, comme le TNFR2. Les protéines CIAP1 et 2 ont un domaine CARD et sont capables de reconnaître la caspase 8 et de l'inhiber. L'activation de la protéine IKK comme celle de CIAP conduisent à une inhibition de l'apoptose, ce qui illustre bien le rôle double que peut jouer le TNF selon le contexte cellulaire, c'est-à-dire l'équipement cellulaire en récepteurs et en protéines adaptatrices.

- la protéine RIP1 ou RIPK1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*) est une sérine/thréonine kinase également impliquée dans l'activation de la voie NFκB. Elle interagit par l'intermédiaire de son domaine DED ;
- les protéines CIAP1 et 2 (*BIRC2 et 3*), qui sont des IAP nanties de domaines CARD qui leur permettent d'interagir directement avec la caspase 8 pour inhiber sa fonction pro-apoptotique, ainsi qu'avec les protéines adaptatrices TRAF et FLIP. Elles sont capables d'inhiber la voie NFκB *via* l'inactivation de NIK (*NFκB-inducing kinase*) par son engagement dans le protéasome.
- la protéine DAXX (*Death-domain associated protein*) a une double localisation et un effet ambivalent sur l'apoptose et la prolifération : nucléaire et anti-apoptotique, elle interagit avec les centromères et active des facteurs de transcription ; cytoplasmique et pro-apoptotique, elle interagit par son domaine DD avec FAS et active la voie de la JUN kinase (JNK) *via* une MAP3K qui pourrait être ASK1 (voir chapitre 2). Elle serait en retour activée par la JNK en une boucle de feed-back positif.

Les récepteurs à dépendance

Il existe une variété particulière de récepteurs impliqués dans le contrôle de l'apoptose, distincts des récepteurs envisagés jusqu'ici : il s'agit des récepteurs à dépendance ou *addiction receptors*. En présence de leur ligand, ces récepteurs transmettent comme tout récepteur un signal de prolifération, de différenciation ou de migration cellulaire. En absence du ligand, ces récepteurs présentent la particularité d'induire l'apoptose. Ils rendent ainsi la cellule dépendante de la présence du ligand pour survivre d'où leur nom de « récepteurs à dépendance ». Cette situation très particulière empêche les cellules exprimant de tels récepteurs de migrer au-delà de la région où diffuse le ligand. Ils exercent donc un contrôle de la migration cellulaire et jouent sans nul doute un rôle fondamental dans l'organogenèse, tant au niveau du système nerveux (migration des neurones) qu'au niveau de la structuration des organes ramifiés (arbre bronchique, etc.).

Une quinzaine de récepteurs fonctionnant selon ce modèle ont été identifiés, appartenant à différentes familles de récepteurs : la famille des RTK (chapitre 1) comme les récepteurs RET, NTRK3 et ALK, la famille des TNFR (p.220) comme le NGFR, ou encore certaines intégrines (chapitre 11) ou le récepteur PTCH de la voie Hedgehog (chapitre 9). Nous nous intéresserons ici à un groupe de récepteurs originaux, les récepteurs de la nétrine 1 (NET1), une protéine sécrétée de la famille des laminines. Ces récepteurs sont DCC (*Deleted in colon cancer*) et les récepteurs UNC5H1 à UNC5H4 ou UNC5A à UNC5D (nommés d'après *Uncoordinated*, le gène correspondant de *Caenorhabditis elegans*). La nétrine 1 est un facteur de guidage axonal ; ligand et récepteurs sont majoritairement exprimés dans le système nerveux au cours du développement, mais aussi, de façon plus ou moins spécifique selon le récepteur, dans divers organes comme le côlon, le poumon, la glande mammaire ou les vaisseaux sanguins.

Les récepteurs à dépendance sont des protéines transmembranaires à un seul domaine transmembranaire ; les récepteurs UNC5H possèdent, au niveau extracellulaire, des domaines *immunoglobulin-like* et des domaines thrombospondine, remplacés dans le récepteur DCC par des domaines fibronectine. Au niveau intracellulaire, les récepteurs UNC5H possèdent un domaine de mort analogue aux domaines de mort des récepteurs FAS ou TNFR, et un domaine d'interaction protéique appelé ZU5 (pour *Zona occludens homolog 5*), domaines que ne possède pas le récepteur DCC. L'oligomérisation des récepteurs en présence de nétrine 1 permet leur activation et la mise en œuvre de voies de signalisation où interviennent des kinases comme FYN, FAK et ERK, éventuellement susceptibles de phosphoryler le récepteur.

L'induction de l'apoptose par les récepteurs à dépendance est moins bien comprise. Elle est obtenue, en absence de ligand, grâce au clivage de la partie intracellulaire du récepteur par une caspase, au niveau d'un domaine ADD (*Addition dependence domain*) (fig. 18-10). Dans le cas de DCC, il se produit ensuite une activation de la caspase 9 *via* des protéines adaptatrices. Dans le cas des récepteurs UNC5H, le clivage permet de démasquer le domaine de mort et le domaine ZU5. Le

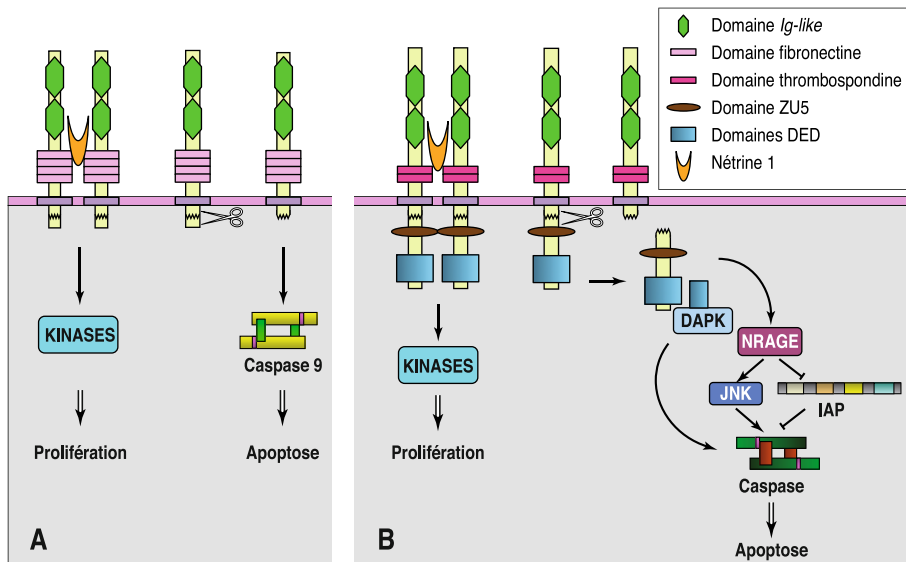


Fig. 18-10 – Les récepteurs à dépendance.

A. Activation d'un récepteur DCC. À gauche, le récepteur est lié à la nétrine 1 et transmet un signal de prolifération. En absence de nétrine 1, il est clivé par une caspase au niveau du domaine ADD (au centre) et peut alors activer la caspase 9 et induire l'apoptose (à droite).

B. Activation d'un récepteur UNC5H. À gauche, le récepteur est lié à la nétrine 1 et transmet un signal de prolifération. Au centre, en absence de nétrine 1, il est clivé par une caspase au niveau du domaine ADD. À droite, son domaine ZU5, *via* une protéine adaptatrice NRAGE, peut alors activer la JNK et inhiber une protéine IAP, cependant que son domaine de mort peut activer une protéine DAPK, et induire également l'apoptose.

domaine de mort interagit avec une sérine/thréonine kinase, la DAPK (*Death associated protein kinase*), qui contient un domaine de mort homologue, responsable de l'induction de l'apoptose *via* l'activation de caspases. Le domaine ZU5 recrute une protéine appelée NRAGE (*Neurotrophin receptor melanoma antigen homolog*) qui est capable d'activer la voie JNK (*JUN N-terminal kinase*, chapitre 2) et d'inhiber les protéines IAP (voir p. 218).

DCC joue un rôle important dans le renouvellement des cellules de la muqueuse colique. La nétrine 1 est produite par les cellules du fond des villosités intestinales et DCC est exprimé tout au long des villosités : les cellules proliférantes, au fond des cryptes, sont donc protégées de l'apoptose alors que les cellules différenciées, migrant vers le sommet des villosités, s'éloignent de la source de nétrine 1 et sont ainsi progressivement conduites vers l'apoptose. Le gradient de nétrine 1 constituerait un mécanisme régulateur de la durée de vie des cellules intestinales, en éliminant les cellules arrivées au sommet des villosités, où elles ont été soumises aux agressions mécaniques et chimiques répétées de la lumière intestinale et doivent être remplacées.

Altérations oncogéniques des voies de l'apoptose

De nombreuses altérations des voies de contrôle de l'apoptose sont rencontrées dans les cellules cancéreuses. Toutefois, la question est rarement résolue de savoir si ces altérations sont la cause ou la conséquence de l'oncogenèse ; en d'autres termes, si ces altérations jouent un rôle moteur (*driver*) de l'oncogenèse ou si elles n'interviennent qu'en second plan, pour faciliter la survie des cellules cancéreuses sans être indispensables à la transformation maligne. Nous ne présenterons pas ici les altérations oncogéniques des mécanismes inducteurs de l'apoptose (comme les mutations de p53), qui ont été envisagées dans le chapitre 17 (contrôle de l'état de l'ADN).

Au niveau de l'apoptose mitochondriale, BCL2 se comporte comme un proto-oncogène, en particulier dans les lymphomes malins : sa surexpression, liée en particulier à la translocation t(14;18) qui le place sous la dépendance d'un promoteur fort, celui du gène des chaînes lourdes d'immunoglobulines, est certainement l'événement initiateur des lymphomes folliculaires. Selon les tissus où ils s'expriment normalement, d'autres gènes de la famille BCL2 peuvent jouer un rôle oncogénique, comme MCL1. Il n'est pas certain, en revanche, que les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2, BAX et BAK, jouent un rôle de gènes suppresseurs de tumeurs. Des délétions ou des mutations inactivatrices de BAX ont été toutefois signalées.

Au niveau de l'apoptose extrinsèque, des mutations de FAS sont observées dans les lymphomes malins non hodgkiniens de diverses sortes, faisant de ce récepteur un véritable gène suppresseur de tumeurs. Par ailleurs, on observe classiquement dans de nombreuses tumeurs une diminution de l'expression des récepteurs de mort comme FAS et une augmentation de l'expression des récepteurs leurres. L'ambivalence des voies de signalisation situées en aval de l'activation des récepteurs de mort ne permet pas facilement d'inférer quelles anomalies auront un effet au niveau de la prolifération : cela dépend du type cellulaire et du « contexte », c'est-à-dire de la disponibilité des facteurs protéiques individuels impliqués dans cette signalisation. Il est difficile de

faire jouer à TRAIL et à ses récepteurs un véritable rôle de suppresseurs de tumeurs en dehors de certains modèles murins, encore que des mutations aient été observées au niveau du récepteur TRAILR2 dans des tumeurs humaines variées.

Certains auteurs ont décrit un rôle suppresseur de tumeur aux caspases initiatrices, en particulier la caspase 8 dans le neuroblastome où existe une hyperméthylation de son promoteur. Enfin, certaines protéines IAP pourraient jouer un rôle oncogénique ; les gènes *BIRC2* et *BIRC3* (protéines CIAP1 et 2) sont amplifiés dans des carcinomes divers ; ils peuvent être en revanche délétés dans le myélome multiple, perdant ainsi la possibilité d'entraîner la protéine NIK vers le protéasome et favorisant l'action du facteur de transcription NFκB (voir chapitre 12).

Quant aux récepteurs à dépendance, ce sont des suppresseurs de tumeur dont DCC est le modèle. Le gène DCC est parfois muté, mais surtout fréquemment perdu dans les cancers du côlon par délétion de la zone où il se trouve sur le chromosome 18. La surexpression de la nétrine 1 est associée à l'oncogenèse et à la progression tumorale de nombreux modèles expérimentaux et se rencontre fréquemment dans les cancers humains. Par analogie, il semble que les gènes *UNC5H* soient tous des gènes suppresseurs de tumeurs.

Cibles pharmacologiques

Même s'il n'existe que peu d'altérations oncogéniques primordiales au niveau des voies de l'apoptose, celles-ci constituent néanmoins un réservoir potentiel de cibles thérapeutiques soit pour favoriser un déséquilibre vers l'apoptose des cellules tumorales, soit pour amplifier l'action des agents thérapeutiques qui induisent l'apoptose par création de lésions de l'ADN.

Au niveau de l'apoptose mitochondriale, des molécules susceptibles d'induire l'apoptose en mimant l'activité des protéines *BH3-only* ont permis le développement de peptides BH3-mimétiques et de petites molécules reconnaissant les domaines correspondants sur les protéines anti-apoptotiques afin de les inhiber. Par ailleurs, l'inhibition de la production BCL2 par une stratégie antisens est possible et a fait l'objet d'essais cliniques.

Au niveau de l'apoptose déclenchée par les récepteurs de mort, l'utilisation d'analogues ou d'agonistes des ligands peut être prise en considération. Il est impossible d'utiliser FASL, qui est fortement hépatotoxique, mais le TNF lui-même peut être utilisé dans une approche de membre isolé perfusé pour le traitement de sarcomes des membres ou des métastases distales des mélanomes. Cette approche n'est réalisable que dans des services spécialisés, car le passage de la molécule dans la circulation générale est létal. TRAIL est en revanche utilisable en traitement général et des formes recombinantes ont été introduites dans des essais cliniques. Des anticorps agonistes des récepteurs de TRAIL sont également en développement : ils sont susceptibles de mimer la liaison du ligand avec le récepteur et de stabiliser les complexes DISC, voire de les agréger.

De grands espoirs sont mis dans le ciblage des protéines inhibitrices des caspases (IAP). Toutes ne sont pas exprimées de façon ubiquiste, mais cinq ou six d'entre elles

pourraient servir de cible à un développement clinique d'inhibiteurs, en particulier la survivine. Une approche antisens a montré la validité de l'approche ; des petites molécules antagonistes de XIAP et de la survivine sont en développement. Des molécules susceptibles de mimer l'action de SMAC-DIABLO sont également recherchées.

Enfin, les récepteurs à dépendance peuvent faire l'objet d'approches thérapeutiques : des molécules permettant le blocage (*titration*) ou la séquestration de la nétrine 1 pourraient être utilisées en thérapeutique et leur développement a déjà commencé. Le rôle d'UNC5H2 dans le développement des vaisseaux en fait en outre une cible intéressante pour combattre l'angiogenèse tumorale.

Bibliographie

- Ashkenazi A. (2008) Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nat Rev Drug Discov*; 7: 1001-12.
- Ashkenazi A. (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer*; 2: 420-30.
- Bao Q, Shi Y. (2007) Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ*; 14: 56-65.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Diff*; 13: 1396-402.
- Chipuk JE, Green DR. (2008) How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*; 18: 157-64.
- Cory S, Adams JM. (2002) The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*; 2: 647-56.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*; 14: 193-209.
- Fesik SW. (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer*; 5: 876-85.
- Igney FH, Krammer PH. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*; 2: 277-88.
- Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*; 8: 782-98.
- Kang MH, Reynolds CP. (2009) Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*; 15: 1126-32.
- Kruyt FAE. (2008) TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett*; 263: 14-25.
- LaCasse EC, Mahoney DJ, Cheung HH *et al.* (2008) IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene*; 27: 6252-75.
- Lessene G, Czabotar PE, Colman P. (2008) BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*; 7: 989-1000.
- Li J, Yuan J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*; 27: 6194-206.
- Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M *et al.* (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev*; 35: 280-8.
- Marzo I, Naval J. (2008) Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*; 76: 939-46.

- Okada H, Mak TW. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*; 4: 592-603.
- Vogler M, Dinsdale D, Dyer MJ, Cohen GM. (2009) Bcl-2 inhibitors: small molecules with a big impact on cancer therapy. *Cell Death Differ*; 16: 360-7.
- Yip KW, Reed JC. (2008) Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*; 27: 6398-406.
- Youle RJ, Strasser A. (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9: 47-59.
- Yu JW, Shi Y. (2008) FLIP and the death effector domain family. *Oncogene*; 27: 6216-27.

Annexe A

Le contrôle de la réplication et de la réparation de l'ADN

Introduction

Nous étudierons dans cette annexe quelques points fondamentaux concernant la structure, la réplication et la réparation de l'ADN. Les cancers sont des maladies des gènes, liées à l'apparition de mutations ou de réarrangements du matériel génétique survenant le plus souvent au niveau d'une cellule somatique, en particulier lorsqu'elle est exposée à des agents mutagènes de notre environnement (le terme environnement étant pris au sens large). La réplication de l'ADN est la cible de nombreuses approches pharmacologiques ayant pour objectif de traiter les cancers en empêchant la multiplication des cellules proliférantes :

- certains agents se lient de façon covalente aux bases azotées constitutives des molécules d'ADN (agents alkylants et platinants) ;
- d'autres inhibent la synthèse des constituants nucléotidiques de l'ADN et perturbent la structure de ce dernier (antimétabolites) ;
- d'autres stabilisent des coupures induites dans l'ADN par des enzymes, les topoisomérases, chargées de moduler la structure dans l'espace de l'ADN (inhibiteurs de topoisomérases) ;
- d'autres enfin s'opposent à l'étape ultime de la reproduction cellulaire, la mitose, en perturbant le fuseau achromatique fait de microtubules sur lequel s'accrochent les chromosomes (poisons du fuseau).

Tous ces agents sont des anticancéreux par le fait qu'ils s'opposent à la multiplication des cellules proliférantes, cancéreuses ou non. Ils ne font pas l'objet de notre étude. Nous nous intéresserons plutôt au contrôle des événements présidant d'une part à la réplication de l'ADN et d'autre part à la réparation des lésions de l'ADN. Nous y ajouterons les processus de contrôle de la protection des extrémités des chromosomes (télomères) à la fin de la réplication. Ces trois processus sont souvent perturbés dans les cellules cancéreuses dont l'instabilité génomique est une des caractéristiques les plus déterminantes. Ils font l'objet de recherches intenses pour y localiser des points d'attaque pertinents pour le traitement des cancers.

Organisation générale du génome

Nous reprendrons simplement dans ce paragraphe quelques données essentielles sur le génome humain, destinées à comprendre la nature et le rôle des altérations concourant à l'oncogenèse.

Chromosomes et chromatine

Le génome humain est constitué de deux fois 3,2 milliards de paires de nucléotides répartis en deux fois vingt-trois chromosomes. Un rappel de la structure des nucléotides et de l'ADN est donné figures A-1 et A-2. Chaque chromosome contient une seule molécule d'ADN sous une forme compactée à l'extrême (fig. A-3). Les chromosomes ne sont identifiables que pendant la mitose, au cours de laquelle ils sont très compacts. En dehors de la mitose, cette compaction est moindre et les chromosomes ne sont plus directement identifiables. Dans les chromosomes, l'ADN est associé à de nombreuses protéines, l'ensemble formant la chromatine. On distingue l'hétérochromatine, très compacte, qui ne peut être le siège des opérations de transcription, et l'euchromatine, plus relâchée, où peuvent se dérouler ces opérations. La chromatine est constituée de particules enchaînées linéairement, appelées nucléosomes, empilés les uns sur les autres à la manière d'un collier de perles. Chaque nucléosome est constitué d'une partie centrale cylindrique protéique autour de laquelle s'enroule l'ADN (fig. A-4).

Les protéines constitutives du nucléosome sont les histones, protéines basiques interagissant avec l'ADN par des liaisons ioniques. La partie centrale du nucléosome est un octamère rassemblant deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4, l'histone H1 servant aux interactions entre nucléosomes. Les histones subissent de multiples modifications post-transcriptionnelles qui modulent leur interaction avec l'ADN et participent à la régulation de la transcription (Annexe B) : méthylations, acétylations, phosphorylations en particulier.

Séquences génomiques

Seule une partie des séquences d'ADN des chromosomes constitue les gènes et, à l'intérieur de ceux-ci, seule une partie code pour la synthèse de protéines. À proximité des séquences codantes des gènes, de nombreuses séquences régulatrices de leur transcription ont été identifiées. Il existe dans le génome, en dehors des gènes, de nombreuses séquences non codantes, dont certaines sont répétitives, et dont la fonction n'est pas toujours connue.

Les gènes

Les gènes contiennent l'information nécessaire à la synthèse des protéines. Cette information est discontinue dans le génome eucaryote, et les séquences informatives

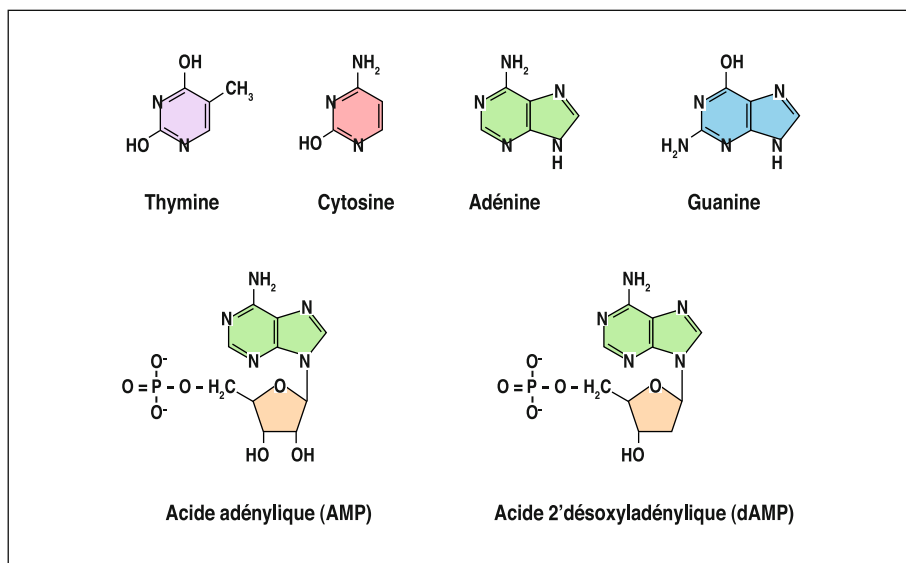


Fig. A-1 – Structure des éléments constitutifs de l'ADN.

Structure des quatre bases azotées de l'ADN, d'un nucléotide 5' phosphate et d'un désoxynucléotide 5' phosphate.

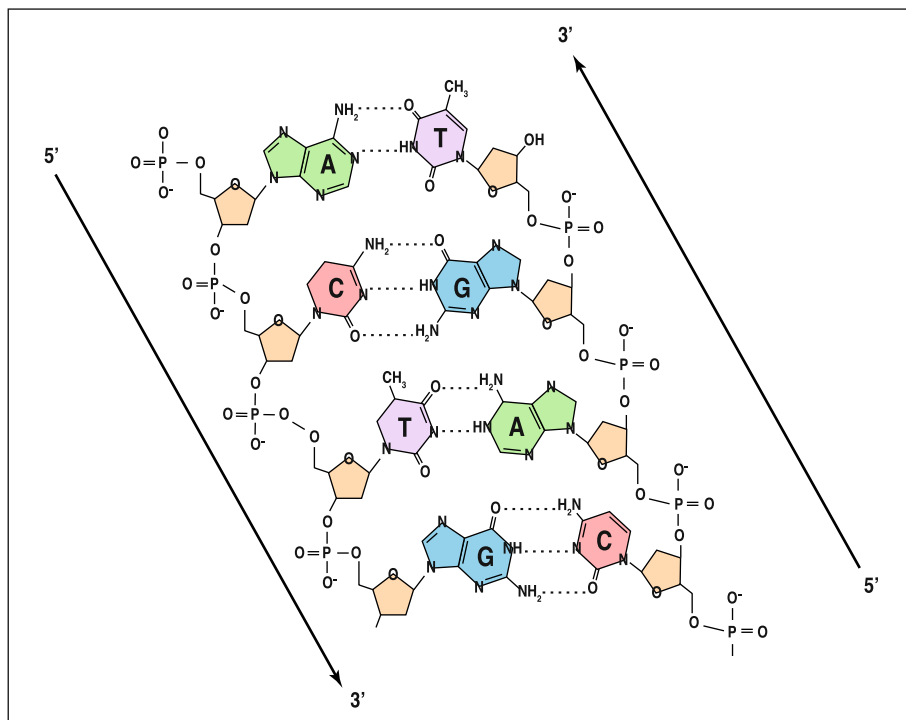


Fig. A-2 – Structure primaire d'un fragment d'ADN.

Les appariements entre les bases (liaisons hydrogène) sont représentés en pointillés.

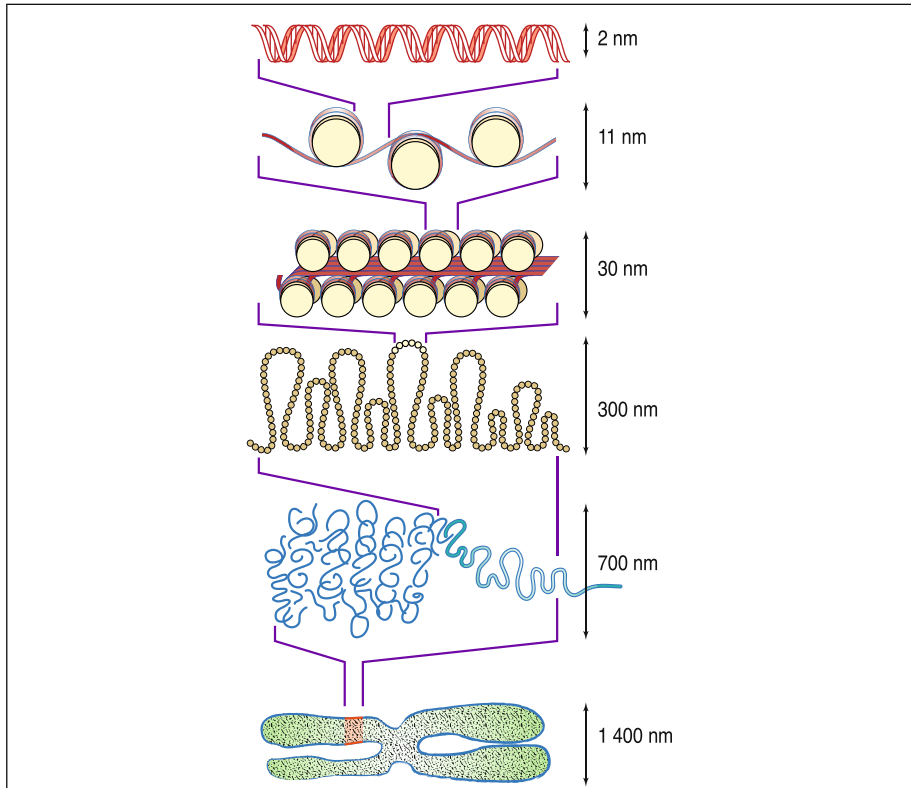


Fig. A-3 – Empaquetage de l'ADN dans les chromosomes.

Cet empaquetage est indispensable pour faire tenir une molécule linéaire de plus d'un mètre de long dans un noyau cellulaire.

(codantes) appelées exons sont séparées par des séquences non informatives, appelées introns (fig. A-5). De part et d'autre des séquences codantes se trouvent les extrémités non traduites (5'UTR et 3'UTR) jouant un rôle régulateur. La séquence protéique sera donc déterminée par la séquence nucléotidique des seuls exons ; toutefois, le début du premier exon et l'extrémité du dernier exon peuvent ne pas coder et jouer un rôle régulateur. Les jonctions entre exons et introns possèdent de courtes séquences caractéristiques qui seront reconnues lors de la maturation des ARN messagers (voir Annexe B).

Les séquences régulatrices de la transcription des gènes sont localisées particulièrement en amont du premier exon, dans une région appelée promoteur. Ces séquences peuvent être reconnues par des protéines spécifiques appelées facteurs de transcription. D'autres séquences régulatrices, parfois distantes de plusieurs milliers de bases, sont appelées « *enhancers* » ou « *silencers* ». On peut les rencontrer aussi dans les introns ou en aval du dernier exon.

Notons que tous les gènes ne codent pas pour des protéines, mais pour des ARN particuliers qui ne seront pas traduits (ARN ribosomiques, ARN de transfert, micro-ARN, etc.) (voir Annexe B).

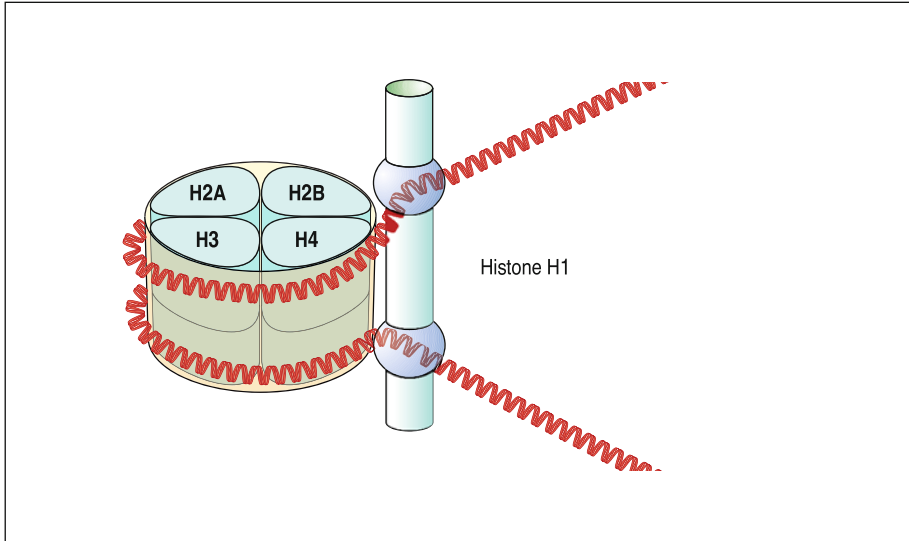


Fig. A-4 – Structure des nucléosomes.

Les nucléosomes sont constitués de dimères contenant chacun quatre molécules d'histone : H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 sert d'armature inter-nucléosomique.

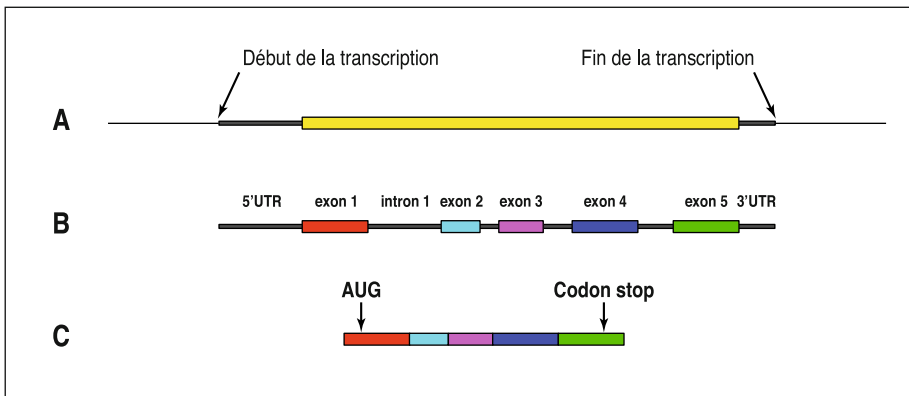


Fig. A-5 – Structure discontinue des gènes eucaryotes.

Le gène (A) contient un ensemble de séquences qui sont transcrites en ARN messager primaire (B), mais l'ARN messager est ensuite mûré (C) et seules certaines de ces séquences seront traduites en protéines, les exons. Les extrémités 5' et 3' UTR et les introns ne seront pas traduits en protéines. Les introns sont éliminés par épissage (voir Annexe B). Ce sont des codons particuliers rencontrés sur l'ARN messager qui indiquent le début (généralement dans l'exon 1) et la fin (généralement dans le dernier exon) de la traduction (voir Annexe C).

Les séquences structurales des chromosomes

Plusieurs sites chromosomiques contiennent des séquences essentielles aux fonctions même des chromosomes : au niveau du centromère, où se fait l'attachement du chromosome sur le fuseau mitotique ; au niveau des télomères, extrémités des chromosomes qui doivent être protégées de l'attaque des exonucléases (voir p. 258) ; au niveau des origines de réplication, dispersées le long des chromosomes.

Les séquences répétitives

Environ 50 % du génome est constituée de séquences qui sont répétées, soit les unes des autres, à la suite, en tandem, soit de façon dispersée dans le génome. Elles sont de taille variable, constituées de répétitions d'un motif unitaire plus ou moins complexe. Selon la taille du motif et le nombre de répétitions, on distingue : (i) les microsatellites (*Short Tandem Repeats* ou STR), comportant des séries de répétitions n'excédant pas le plus souvent quelques dizaines, d'un motif court (en majorité de un à cinq nucléotides) que l'on rencontre en de nombreux points du génome. On peut les rencontrer dans certains introns, en particulier des répétitions des deux nucléotides C et A (*CA repeats*). Le nombre de ces répétitions varie d'un individu à l'autre, ce qui représente un polymorphisme pouvant être utilisé comme marqueur génétique ; (ii) les minisatellites, ayant des motifs de quelques dizaines de nucléotides répétés jusqu'à quelques centaines de fois, très polymorphes dans leur séquence et le nombre de répétitions et qui sont également dispersés dans le génome ; (iii) les satellites, pour lesquels le motif, qui peut comporter jusqu'à quelques centaines de nucléotides, est répété un très grand nombre de fois (de l'ordre de 500 000 à 1 000 000). Parmi les séquences dispersées, on distingue :

- les séquences SINE (*Short interspersed elements*), qui contiennent de 100 à 300 nucléotides. L'une d'elles, la séquence Alu, de 282 nucléotides, est rencontrée en moyenne toutes les 4 000 paires de bases, et près d'un million de copies sont donc présentes dans le génome humain. Elles ne codent pour aucune protéine et leur rôle est inconnu. Elles dériveraient d'un gène codant pour l'ARN de la *Signal recognition particle* dont les transcrits se seraient réinsérés dans le génome ;
- les séquences LINE (*Long interspersed elements*), qui contiennent de 5 000 à 7 000 nucléotides. Elles dériveraient de certains transcrits de l'ADN polymérase II ou d'une rétrotranscriptase qui se seraient réinsérés dans le génome. Il en existe environ 500 000 dans le génome humain, souvent incomplètes. Elles possèdent à leurs extrémités des séquences LTR (*Long terminal repeat*) à la manière des virus.

Les éléments transposables

Les séquences SINE et LINE sont des séquences mobiles susceptibles de se déplacer de manière aléatoire d'un site chromosomique à l'autre ; ces séquences codent précisément pour les enzymes capables de réaliser leur transposition soit directement (transposons), soit après rétrotranscription (rétrotransposons). Dans les cellules

normales, ces gènes ne sont pas exprimés en raison d'une méthylation importante de leurs promoteurs (voir Annexe B). Dans de nombreux cancers, ces gènes sont réactivés, en liaison avec une perte de cette méthylation, mais le mécanisme de la réactivation de la transcription de ces séquences n'est pas compris ; il pourrait être lié à l'instabilité génique caractéristique des cancers et a été attribué à des agents génotoxiques, incluant les agents anticancéreux. Par ailleurs, l'activité de transposition portée par les protéines synthétisées amplifie de façon importante cette instabilité génique et, selon le lieu de réinsertion des éléments transposés, est susceptible d'inactiver des gènes suppresseurs de tumeurs, voire d'activer des proto-oncogènes. La réactivation de l'activité de rétrotransposition dans les cancers s'accompagne d'un mauvais pronostic. L'inhibition de cette activité *in vitro* provoque l'arrêt de la prolifération cellulaire et une voie de recherche thérapeutique pourrait s'orienter vers l'inhibition de la rétrotranscriptase codée par *LINE1*.

Les principales altérations du génome

Un certain nombre de maladies, dont font partie les cancers, sont liées à des altérations du génome. Certaines sont ponctuelles et ne portent que sur un nucléotide : elles ne sont objectivables que par séquençage. D'autres correspondent à des réarrangements majeurs et peuvent parfois être décelées par cytogénétique. Par ailleurs, des variations communes de la séquence des gènes sont rencontrées tout au long du génome et sont responsables de l'extrême diversité de l'espèce humaine : ce sont les polymorphismes génétiques.

Altérations ponctuelles : mutations et polymorphismes

Des erreurs survenant au cours de la réplication ou induites par des agents mutagènes peuvent conduire au remplacement d'un nucléotide par un autre (mutation par substitution), à la perte d'un nucléotide (délétion) ou à l'addition d'un nucléotide (insertion). La protéine issue du gène muté peut porter en conséquence une altération de structure pouvant conduire à une réduction d'activité ou à la perte complète de sa fonctionnalité. Ces mutations sont à l'origine de nombreuses maladies héréditaires congénitales lorsqu'elles surviennent dans la lignée germinale, et de cancers lorsqu'elles surviennent dans une lignée somatique. On distingue les mutations silencieuses (conservation de l'acide aminé de la chaîne protéique), les mutations faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre) et les mutations non-sens qui conduisent à une protéine tronquée (survenue d'un codon stop, altération d'un site d'épissage). Insertions et délétions modifient le cadre de lecture, donc la séquence de la protéine, et sont par principe des mutations non-sens. On trouvera dans l'Annexe C (tableau C-1) un rappel du code génétique et des abréviations usuelles des acides aminés.

Outre ces altérations pathologiques, rares mais délétères, existent de nombreuses variations individuelles de la séquence génomique que l'on appelle polymorphismes génétiques. Leur fréquence varie d'un gène à l'autre ; elle est plus élevée dans les introns que dans les exons. Elles sont le support, la plupart du temps, de variations

phénotypiques mineures et expliquent les différences individuelles, depuis la couleur des yeux ou la forme du visage jusqu'à la prédisposition héréditaire à certaines maladies ou la sensibilité à certains médicaments : à ce titre, les polymorphismes génétiques intéressent le médecin ou le pharmacologue. Notons que tous les polymorphismes ne sont pas de simples substitutions d'un nucléotide par un autre (SNP, *Single nucleotide polymorphism*) : il existe des polymorphismes du nombre de répétitions de séquences micro- ou minisatellitaires, comme mentionné plus haut. Il existe également des variations du nombre de copies de certains gènes (CNV, pour *Copy number variations*), que l'on peut considérer comme des polymorphismes et qui peuvent jouer un rôle important dans le niveau d'expression des gènes.

Mutations par substitution et SNP sont donc biochimiquement identiques (remplacement d'un nucléotide par un autre), mais ont une signification très différente : on utilisera le terme de mutation pour les événements rares et délétères et le terme de polymorphisme pour les événements fréquents (au moins 10 % de fréquence allélique, soit 1 % de sujets homozygotes variants) et non délétères. Comme pour les mutations, on distingue les polymorphismes silencieux et les polymorphismes non synonymes, avec remplacement d'un acide aminé par un autre au niveau de la protéine. Il faut noter que les polymorphismes silencieux peuvent avoir des conséquences : la fréquence d'utilisation des divers codons est variable, et la population des ARN de transfert correspondants peut ne pas y être adaptée ; la synthèse de la protéine peut s'en trouver ralentie, et parfois son repliement sera défectueux. Par ailleurs, la structure dans l'espace de l'ARN messager peut être différente en raison du remplacement d'un nucléotide par un autre, et cela peut avoir des conséquences sur la stabilité des ARN messagers et sur la vitesse de la traduction en protéine, donc sur la quantité de protéine exprimée.

Réarrangements du génome

Des anomalies de la méiose, plus rarement de la mitose, peuvent conduire à des réarrangements importants du génome. Les trisomies sont les réarrangements les plus fréquents, avec des conséquences pathologiques majeures. Des délétions et insertions de segments chromosomiques surviennent lors de phénomènes de recombinaison homologue ou de transposition. La duplication de certains gènes peut survenir dans la lignée germinale, au cours de la méiose, mais l'amplification, qui conduit à la multiplication parfois considérable du nombre de copies d'un gène, ne survient généralement que dans des lignées somatiques et s'observe dans les cellules cancéreuses. Enfin, les translocations chromosomiques, dues à une recombinaison inégale entre séquences homologues dans deux chromosomes différents, s'observent également dans les cancers, tout particulièrement les leucémies.

La machinerie de la réplication

La réplication de l'ADN se déroule durant la phase S du cycle cellulaire (chapitre 17). Il s'agit d'un processus semi-conservatif, comme cela a été montré voici plus de cinquante ans par Meselson et Stahl : chacun des deux brins sert de matrice (*template*)

pour être recopié, de façon complémentaire, par une ADN polymérase. Les éléments constitutifs de l'ADN, les quatre 2'-désoxynucléotides, sont apportés sous forme triphosphate, ce qui fournit non seulement le matériau nécessaire, mais aussi l'énergie indispensable à leur assemblage. Cette polymérisation se fait, pour les deux brins, dans le sens $5' \rightarrow 3'$, de façon bidirectionnelle, antiparallèle et par appariement de désoxyanucléotides complémentaires qui sont attachés les uns aux autres par une liaison phosphodiester catalysée par une ADN polymérase. L'un des deux brins de la matrice est copié de $3'$ en $5'$ de façon continue pour générer un brin dit « avancé » (*leading strand*) ; l'autre brin, obligatoirement copié également de $3'$ en $5'$, le sera de façon discontinue, par fragments d'environ 200 désoxyanucléotides appelés fragments d'Okazaki ; le nouveau brin, dit « retardé » (*lagging strand*), devra subir ultérieurement une ligation des fragments ainsi générés (fig. A-6). Les deux nouveaux brins sont synthétisés simultanément par l'ADN polymérase δ et ϵ (POL δ et POL ϵ), grâce au fait que ces enzymes agissent sous forme dimérique et que l'ADN matriciel forme une boucle autour d'elles de façon à présenter les désoxyanucléotides destinés à être copiés de façon parallèle pour les deux brins néosynthétisés (fig. A-6B).

La réplication débute simultanément sur de nombreux sites de chaque chromosome appelés « origines de réplication », caractérisés par des séquences précises permettant leur

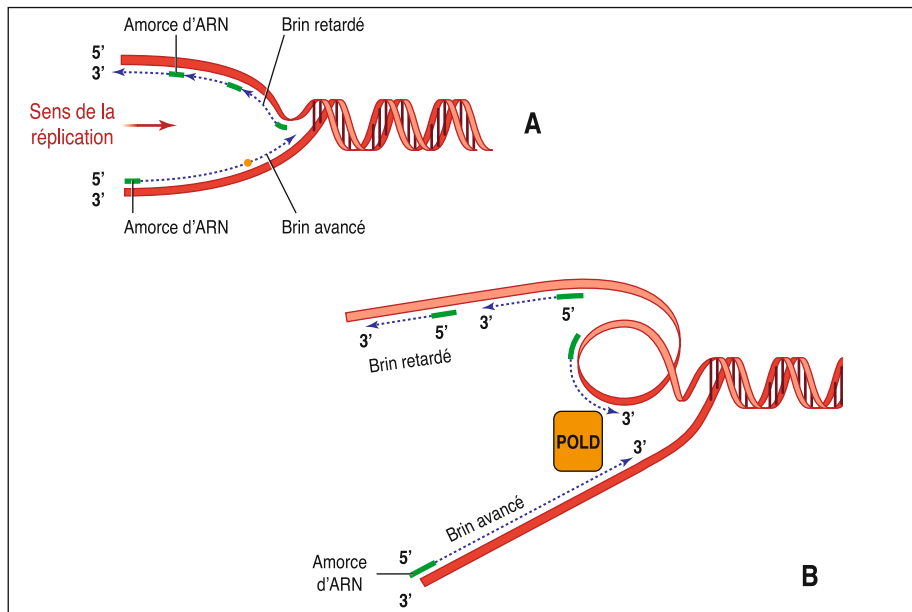


Fig. A-6 – Déroulement de la réplication.

A. Après ouverture de la double hélice, les deux brins sont copiés simultanément dans le sens $5' \rightarrow 3'$, après formation d'une amorce d'ARN remplacée ultérieurement par de l'ADN. Cela exige une synthèse continue de l'un des brins (brin « avancé ») et une synthèse discontinue de l'autre brin (brin « retardé »), par fragments des 200 nucléotides environ (fragments d'Okazaki).

B. Une boucle du brin retardé permet en fait la synthèse des deux brins par le même dimère d'ADN polymérase δ ou ϵ .

reconnaissance par les protéines impliquées dans la réplication. L'ouverture de la molécule d'ADN servant de matrice est réalisée par les topoisomérases 2 (TOP2), enzymes chargées de réaliser des coupures double-brin transitoires permettant la relaxation locale du super-enroulement de la double hélice, et par des hélicases permettant l'ouverture de la double hélice elle-même par rupture transitoire des liaisons hydrogènes impliquées dans l'appariement des bases. La synthèse d'ADN est bidirectionnelle et une « fourche de réplication » progresse dans les deux sens à partir des origines de réplication. Après fixation d'une protéine RPA (*Replication protein A*) au niveau des origines de réplication, un brin d'ARN est d'abord synthétisé par une ARN polymérase appelée primase, en raison du fait que l'ADN polymérase ne peut initier la synthèse, mais seulement la poursuivre à partir d'une amorce (*primer*) d'ARN qui comporte une dizaine de nucléotides. Une fois l'amorce d'ARN synthétisée, l'ADN polymérase α (POLA), associée avec la primase, prend le relais et commence la synthèse d'ADN. Après fixation d'autres protéines d'interaction avec l'ADN, RFC (*Replication factor C*) et PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), les ADN polymérases δ et ϵ prennent en charge l'allongement de la chaîne d'ADN (fig. A-7), la première au niveau du brin avancé, la seconde au niveau du brin retardé. Ces polymérases possèdent, outre leur fonction de synthèse, une fonction d'« édition » ou de relecture (*proofreading*), c'est-à-dire la capacité de vérifier que le dernier nucléotide mis en place est le bon. Cette activité d'édition est d'importance cruciale pour la stabilité du génome et explique que le taux de mutation « endogènes » de l'ADN (c'est-à-dire dues à la réplication) soit très faible, de l'ordre de 10^{-10} . Les souris transgéniques exprimant une polymérase dépourvue d'activité d'édition développent très fréquemment des cancers spontanés. L'amorce d'ARN est ensuite détruite par la RNase H et remplacée par de l'ADN synthétisé par la polymérase δ ou ϵ . La ligase 1 (LIG1) permet au fur et à mesure de joindre les fragments synthétisés de façon discontinue sur le brin retardé.

La réparation de l'ADN*

L'ADN néosynthétisé peut comporter des erreurs, malgré les fonctions d'édition des polymérases δ et ϵ . Il subit également en permanence des agressions par de nombreux agents physiques et chimiques : radiations ultraviolettes ou ionisantes, chaleur, composés mutagènes, radicaux oxygénés, etc. De nombreux mécanismes de réparation doivent intervenir pour restaurer la structure de l'ADN, chacun étant destiné à réparer des lésions précises, sur la base de la complémentarité des deux brins de l'ADN. L'impossibilité de réparer des lésions de l'ADN conduit normalement à la mort cellulaire ; le fait de tolérer des lésions caractérise l'instabilité génomique des cellules cancéreuses et participe aux mécanismes de l'oncogenèse : ces lésions peuvent procurer un avantage adaptatif dont les cellules cancéreuses vont tirer parti pour proliférer et se disséminer dans l'organisme.

* Paragraphe rédigé en collaboration avec le Dr Philippe Pourquier.

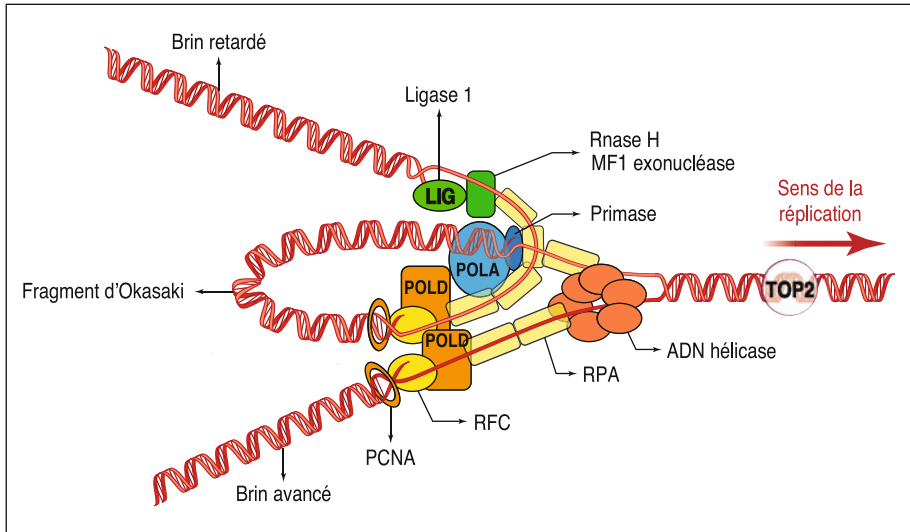


Fig. A-7 – Machinerie de la réplication.

La machinerie de la réplication fait intervenir un nombre important de protéines. Après intervention d'une topoisomérase II (TOP2), une hélicase permet tout d'abord l'ouverture de la double hélice. Après fixation d'une protéine RPA (*Replication protein A*) au niveau des origines de réplication, un brin d'ARN est d'abord synthétisé par une ARN polymérase appelée primase, en raison du fait que l'ADN polymérase ne peut initier la synthèse mais seulement la poursuivre à partir d'une amorce (*primer*) d'ARN qui comporte une dizaine de nucléotides. Une fois l'amorce d'ARN synthétisée, l'ADN polymérase α (POLA), associée avec la primase, prend le relais et commence la synthèse d'ADN. Après fixation d'autres protéines d'interaction avec l'ADN, RFC (*Replication factor C*) et PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), les ADN polymérases δ ou ε prennent en charge l'allongement de la chaîne d'ADN. L'amorce d'ARN est ensuite détruite par la RNase H et remplacée par de l'ADN synthétisé par la polymérase δ ou ε. La ligase 1 (LIG1) permet au fur et à mesure de joindre les fragments synthétisés de façon discontinue sur le brin retardé.

Les lésions de l'ADN

Les lésions de l'ADN sont généralement classées en deux catégories ; la figure A-8 présente ces différents types de lésion.

Lésions d'origine endogène :

- sites abasiques dont la formation résulte le plus souvent de la rupture spontanée de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose ;
- modifications oxydatives des bases, qui aboutissent par exemple à la 8-oxoguanine ;
- désaminations de bases qui entraînent une altération de l'information codante ;
- mésappariements (*mismatch*) résultant d'erreurs non corrigées de l'ADN polymérase ;
- méthylations accidentelles de bases, aboutissant par exemple à la N⁷-méthylguanine ou à la N³-méthyladénine.

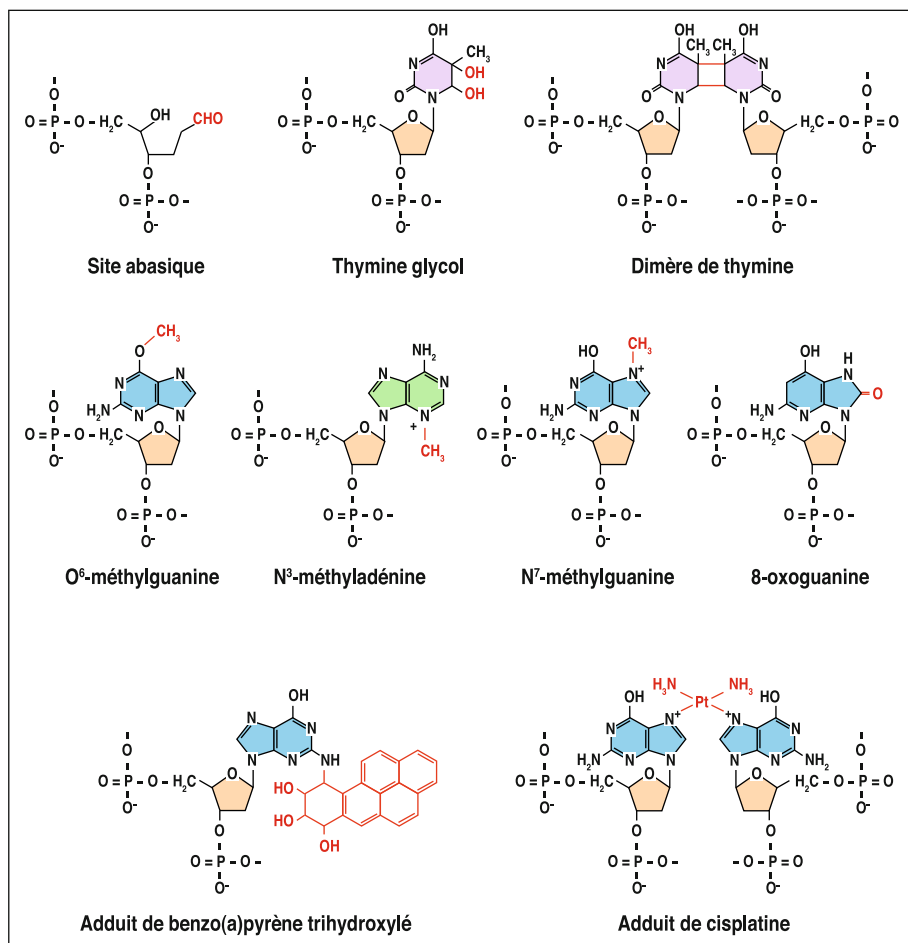


Fig. A-8 – Exemples de lésions des bases azotées de l'ADN.

Les lésions les plus fréquentes proviennent de l'excision ou de la désamination des bases, de leur métabolisme oxydatif ou de leur alkylation. Les rayonnements ultraviolets sont en partie responsables des dimères de thymine. Des adduits volumineux peuvent être formés par réaction avec des molécules génotoxiques, agents carcinogènes ou anticancéreux. Les altérations structurales sont indiquées en rouge.

Lésions d'origine exogène :

- dimères de pyrimidines ou de purines, obtenus par liaison covalente entre deux bases adjacentes et provoqués surtout par les radiations ultraviolettes ;
- adduits d'hydrocarbures aromatiques polycycliques comme le benzopyrène, attaquant les régions riches en électrons des bases azotées ;
- adduits d'autres composés électrophiles attaquant préférentiellement l'azote 7 de la guanine et ses substituants aminé en 2 et oxygéné en 6 ; certains de ces composés sont des agents anticancéreux (alkylants et platines) ;
- coupures double brin résultant de l'action des radiations ionisantes ou de l'action des topoisomérases et qui sont stabilisées par certains agents anticancéreux.

Les mécanismes de réparation de l'ADN

Chaque type de lésion peut être pris en charge par un mécanisme de réparation spécialisé. Le tableau A-1 résume les différents mécanismes et leur mise en jeu à l'égard des différents types de lésion. La première étape de toute réparation est la reconnaissance de la lésion et de son caractère létal ou non ; cette reconnaissance est généralement suivie de l'arrêt du cycle cellulaire permettant, soit la mise en œuvre du mécanisme de réparation approprié, soit la mise en œuvre d'un programme de mort cellulaire si les lésions ne peuvent être réparées correctement (voir chapitre 18). Il peut exister par ailleurs une forme de tolérance des lésions, qui permet aux ADN polymérases de poursuivre la réplication sans réparer l'erreur ; ce phénomène porte le nom de synthèse translésionnelle (*translesion synthesis*).

Tableau A-1 – Principales lésions de l'ADN et mécanismes de réparation associés.

Lésions	Mécanisme de réparation
O ⁶ -méthylguanine	Réparation par réversion directe
Mésappariement de base	Réparation des mésappariements (MMR)
Sites abasiques 8-oxoguanine N ³ -méthyladénine N ⁷ -méthylguanine	Réparation par excision de base (BER)
Lésions occasionnées par les UV (Dimères de thymine) Cassures simple brin N ³ -méthyladénine N ⁷ -méthylguanine Adduits de cisplatine Adduits de dichloroéthyle (moutardes à l'azote) Adduits de cancérogènes (benzopyrène)	Réparation par excision de nucléotide (NER)
Lésions occasionnées par les radiations ionisantes Cassures double brin	Recombinaison homologue (HRR) Recombinaison non homologue (NHEJ)

Réparation par réversion directe

Ce mécanisme (fig. A-9) concerne la réparation des adduits alkylés formés au niveau de l'O⁶ de la guanine par des agents génotoxiques et par certains agents anticancéreux comme les nitrosourées ou le témozolomide. Cette réparation met en jeu une enzyme, la méthylguanine méthyltransférase (MGMT), qui prend en charge le groupement alkyle sur le groupement thiol d'une cystéine. C'est une enzyme-suicide, qui ne peut ensuite être détoxiquée et ne peut donc servir que pour la réparation d'une seule lésion : ce mécanisme est ainsi dépendant de la disponibilité en MGMT, donc de son taux de transcription et de traduction. Le promoteur de son gène est sujet à la méthylation de ses îlots CpG qui gouverne ainsi son niveau d'expression (Annexe B).

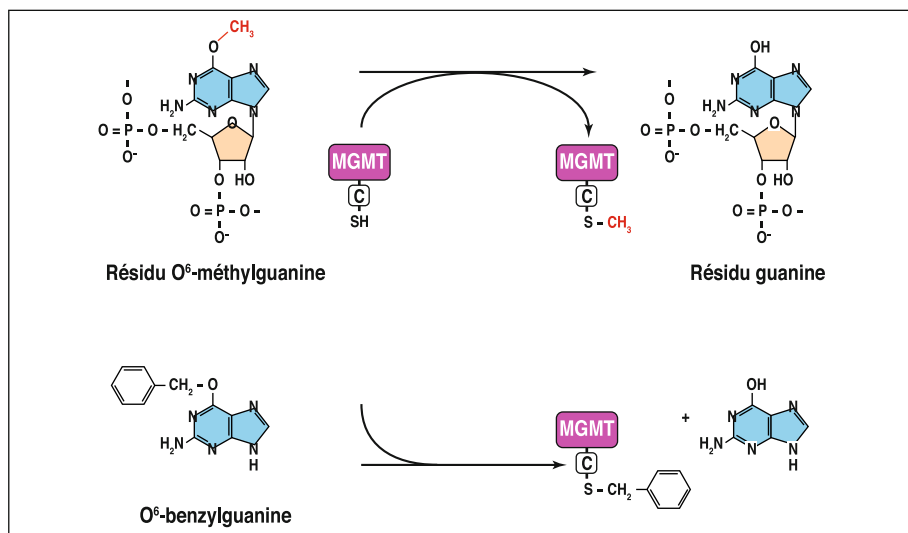


Fig. A-9 – Réparation par réversion directe.

Le groupement méthyle de l'O⁶-méthylguanine est transféré de manière irréversible sur un résidu de cystéine de la méthylguanine méthyltransférase (MGMT). L'utilisation d'un inhibiteur compétitif tel que l'O⁶-benzylguanine permet d'inhiber la MGMT en saturant son activité catalytique et potentialise l'action des agents alkylants.

Ce niveau d'expression est très variable d'un tissu à l'autre et les tumeurs ont été définies comme présentant le phénotype Mer⁺ ou Mer⁻ en fonction du degré d'expression de la MGMT. La mesure de l'expression de la MGMT et/ou de la méthylation du promoteur peut constituer un outil de prédiction de l'activité du témozolomide dans les glioblastomes. Un agent susceptible de contrecarrer l'activité de la MGMT est l'O⁶-benzylguanine qui peut lui servir de leurre en la détournant des sites alkylés de l'ADN. D'autres dérivés de l'O⁶-benzylguanine sont en développement.

Réparation des mésappariements (*Mismatch repair, MMR*)

Ce mécanisme (fig. A-10) vise à corriger les erreurs commises lors de la synthèse de l'ADN par les polymérases δ et ϵ , erreurs non corrigées par leur activité d'édition, et dont la fréquence est estimée, comme nous l'avons vu, à environ 10^{-10} . Des hétérodimères formés par les protéines MSH2 et MSH6, ou MSH2 et MSH3 (MSH : *MutS homolog 2*) pour de très courtes insertions et délétions, sont capables de reconnaître ces lésions et de recruter des protéines spécialisées dans leur réparation, MLH1 (*MutL homolog 1*) et PMS2 (*Postmeiotic segregation increased*), formant un tétramère avec les précédentes. Le complexe glisse à distance du mésappariement puis hydrolyse le brin portant l'erreur sur quelques dizaines de nucléotides en aval, pendant que l'autre brin est protégé des exonucléases par la protéine RPA (*Replication protein A1*). Une nouvelle synthèse de l'ADN est réalisée par l'ADN polymérase β (POLB) et la continuité du brin restaurée par une ligase.

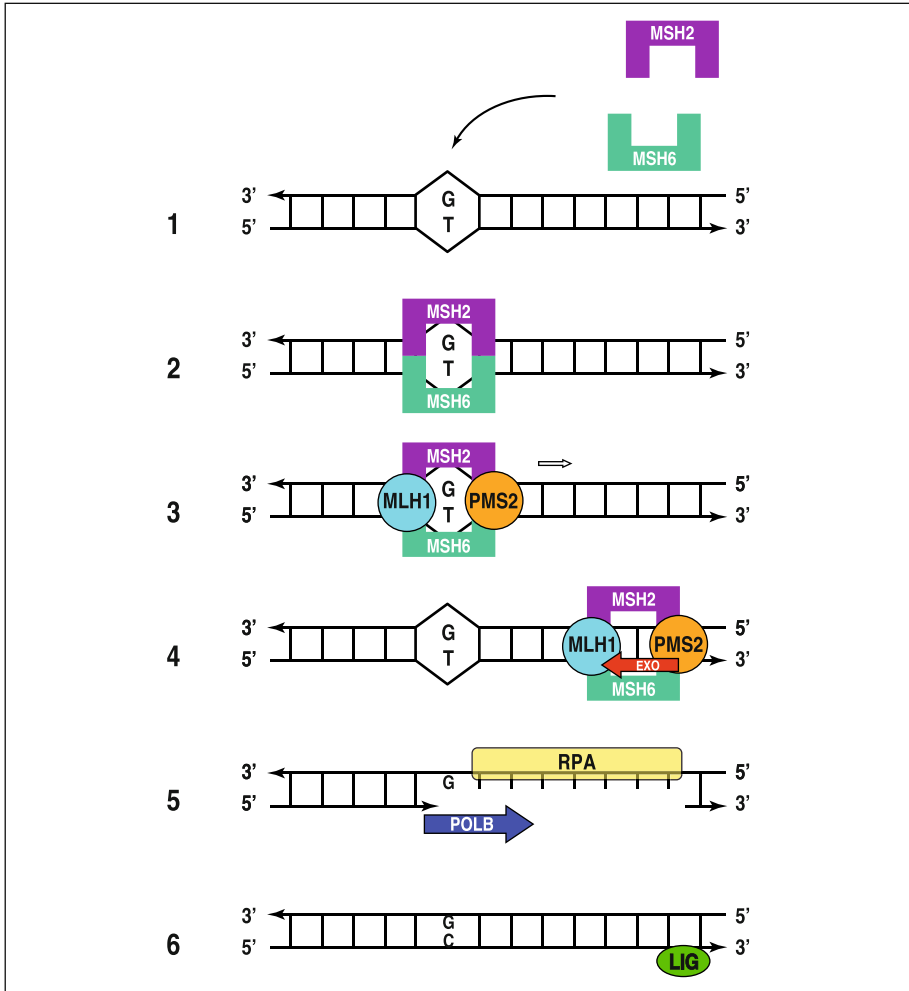


Fig. A-10 – Réparation des mésappariements (MMR).

Le mésappariement (ici G : T) est reconnu par les protéines du complexe MSH2-MSH6 qui recrute ensuite les protéines MLH1 et PMS2. Le tétramère ainsi formé glisse à distance du mésappariement et digère le brin par une exonuclease EXO1 contenant l'erreur à partir d'une interruption de l'ADN jusqu'au mésappariement. La molécule RPA recouvre le simple brin pour empêcher sa dégradation par les nucléases. Une nouvelle synthèse est effectuée par l'ADN polymérase B et la continuité de l'ADN est restaurée par une ligase.

Ce mécanisme de réparation est déficient dans certains cancers qui présentent alors le phénotype d'instabilité microsatellitaire, caractérisé par le fait que les répétitions de dinucléotides caractéristiques de certains microsatellites, difficiles à reproduire à l'identique lors de la réplication de l'ADN, demeurent altérées en absence de MMR fonctionnel. Ce phénomène survient en particulier dans certaines formes des cancers du côlon et de l'ovaire qui présentent un ensemble de caractères phénotypiques particuliers. Il peut être en cause dans les cancers sporadiques lorsque les

mutations des gènes MLH et MSH surviennent dans une cellule somatique et dans les cancers associés à une prédisposition héréditaire lorsqu'elles surviennent dans la lignée germinale d'un individu.

Réparation par excision de base (Base excision repair, BER)

Ce mécanisme (fig. A-11) vise le plus souvent à remplacer les bases azotées altérées par un processus oxydatif endogène. Des ADN glycosylases, dont la nature varie selon la base endommagée, sont capables d'hydrolyser la liaison N-osidique liant la base au désoxyribose et d'éliminer cette base, créant ainsi un site abasique. Ce site est reconnu

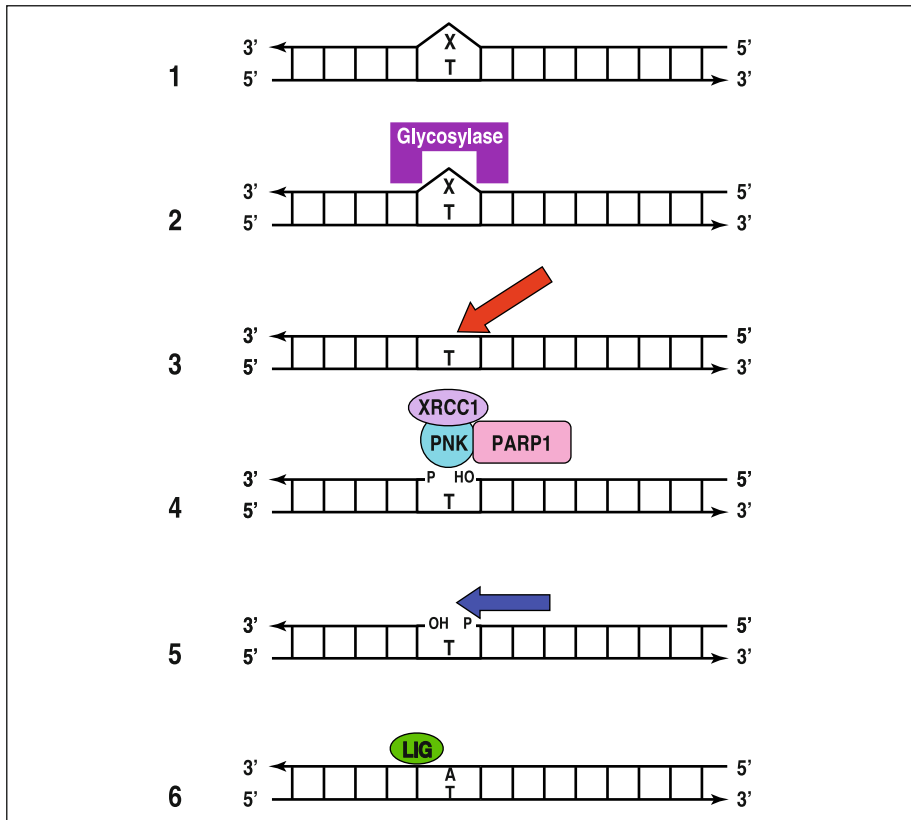


Fig. A-11 – Réparation par excision de base (BER).

La base endommagée (X) est éliminée par une ADN glycosylase spécifique du type de dommage et l'ADN est incisé par l'endonuclease APE1 au niveau du site abasique formé. Les protéines XRCC1 et PARP1 interviennent alors et recrutent une polynucléotide kinase PNK qui phosphoryle l'extrémité 5'OH et déphosphoryle l'extrémité 3'P au niveau de la coupure, étape indispensable pour la restauration de la liaison phosphodiester par l'ADN polymérase. Dans la voie principale appelée *short patch* (seule représentée ici), la base manquante est simplement remplacée par l'ADN polymérase β et la ligation réalisée par l'ADN ligase 3.

par une endonucléase APE1 (*Apurinic-apyriminidic endonuclease 1*) qui hydrolyse la liaison phosphodiester et génère ainsi une coupure simple brin. Les protéines XRCC1 (*X-ray repair cross complementation group 1*) et PARP1 (*Poly(ADP) ribose polymérase 1*) interviennent alors et recrutent une protéine PNK (*Polynucléotide kinase*) qui phosphoryle l'extrémité 5'OH et déphosphoryle l'extrémité 3'P au niveau de la coupure, étape indispensable pour la restauration de la liaison phosphodiester par l'ADN polymérase β , parfois par une ADN polymérase θ ou λ (POLQ, POLL). Le seul nucléotide manquant est remplacé dans le cas du *short patch BER* ; dans le cas du *long patch BER*, cinq à six nucléotides sont ajoutés au niveau de la lésion, ce qui provoque un chevauchement (*flap*) qui devra être éliminé par l'endonucléase FEN1 (*Flap endonuclease*). Dans les deux cas, une ligase doit ensuite restaurer la continuité de l'ADN.

Réparation par excision de nucléotides (Nucleotide excision repair, NER)

Ce mécanisme (fig. A-12), mis en jeu principalement pour la réparation des lésions de l'ADN par les rayons UV, est mis à profit pour réparer d'autres lésions, impliquant en particulier les adduits formés par certains agents alkylants et les platines, surtout au niveau de l'azote 7 de la guanine. Le NER fait intervenir plusieurs protéines incluant les protéines XP, ainsi nommées parce que leurs mutations invalidantes dans la lignée germinale provoquent une maladie appelée *xeroderma pigmentosum*, caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV et une prédisposition héréditaire aux cancers de la peau. La reconnaissance des lésions peut se faire de deux façons :

- dans le cas du *global genome NER* (GG-NER), les lésions sont reconnues, indépendamment de leur localisation dans le génome, par un complexe protéique XPC-RAD23B ;
- dans le cas du *transcription-coupled NER* (TC-NER), seules les lésions survenant au niveau des régions transcrites de l'ADN sont prises en charge, au moment où l'ARN polymérase II doit interrompre son travail de transcription, grâce à l'intervention de protéines nommées CSA et CSB (*Cockayne syndrome A et B*). Le mécanisme est utilisé pour que les gènes transcrits soient plus rapidement réparés.

Dans les deux cas, des hélicases nommées XPD (ERCC2) et XPB (ERCC3), possédant une polarité opposée, et associées au complexe protéique de transcription appelé TFIIF, maintiennent la double hélice en position ouverte pour permettre l'accessibilité aux enzymes de réparation. La protéine XPA reconnaît et vérifie la présence de la lésion, la protéine trimérique RPA se lie à l'ADN endommagé et l'endonucléase XPG (ERCC5) incise le brin endommagé en 3' de la lésion. Intervient ensuite l'endonucléase XPF (ERCC4), en association avec le facteur ERCC1 (*Excision repair cross complementation group 1*), qui incise l'ADN endommagé en 5' de la lésion et libère un fragment simple brin de 24 à 32 nucléotides. L'ADN polymérase δ ou ϵ reconstitue alors la partie excisée en apportant les nucléotides complémentaires à ceux du brin non excisé servant de matrice, et une ligase restaure la continuité de l'ADN.

Le NER est sous le contrôle de p53 (chapitre 17) : les tumeurs ayant une mutation de p53 ne peuvent le mettre en jeu et il en résulte une instabilité génétique accrue. Le niveau d'expression et/ou d'activité des protéines du NER est un facteur important

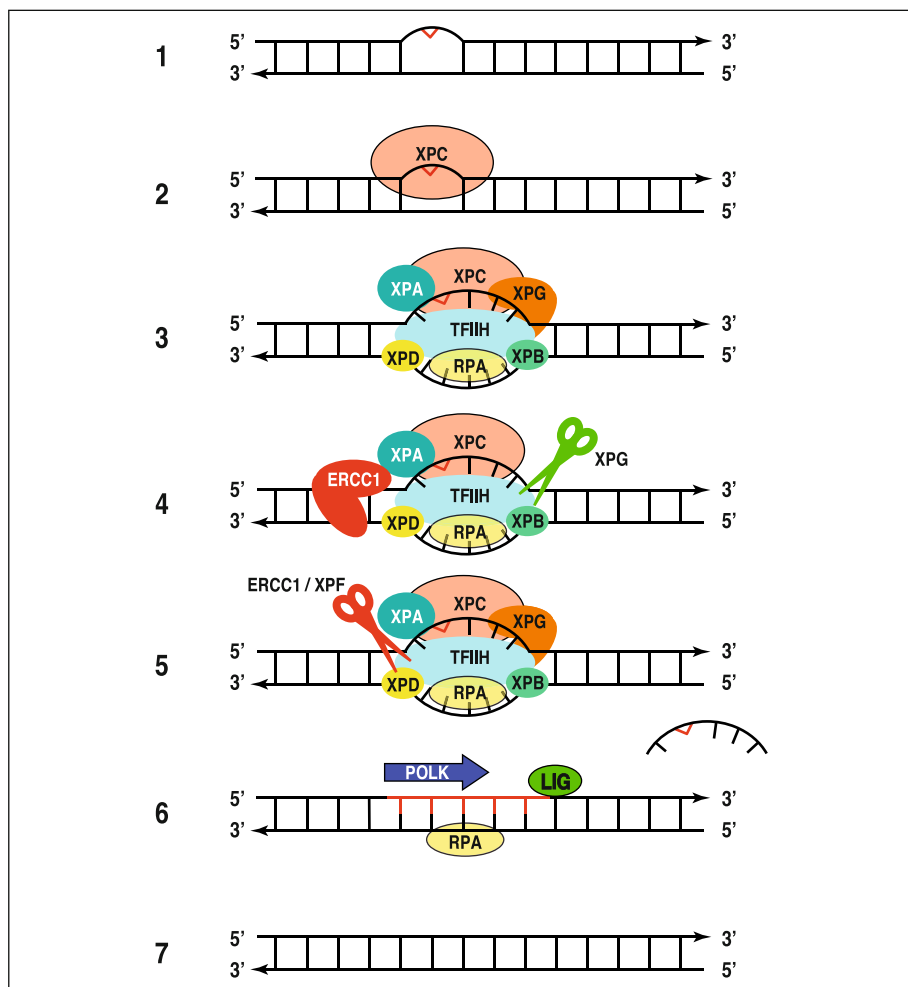


Fig. A-12 – Réparation par excision de nucléotide (NER).

Il existe deux voies du NER selon que la lésion se trouve dans l'ADN non transcrit (*Global genome NER*) ou l'ADN transcrit (*Transcription-coupled NER*). Elles ne diffèrent que par le mode de détection de la lésion. La détection de la lésion est réalisée par le complexe XPC-RAD23B dans le cas du GG-NER, seul représenté ici. Une fois détectée, la lésion est rendue accessible pour les autres protéines de la réparation par maintien de l'ouverture de la double hélice grâce aux deux hélicases XPB et XPD du complexe TFIIH. Les nucléases XPG et XPF-ERCC1 effectuent alors l'excision d'une partie du brin endommagé puis l'ADN polymérase effectue une nouvelle synthèse de brin et la religation est assurée par l'ADN ligase.

de sensibilité aux agents anticancéreux provoquant des lésions de l'ADN réparées par ce mécanisme, comme les dérivés du platine. La surexpression d'ERCC1 est un facteur important de résistance au cisplatine des cancers du poumon non à petites cellules et certains polymorphismes altérant l'efficacité de XPD sans l'invalider sont associés à

l'activité de l'oxaliplatine dans les cancers colorectaux. Le développement de molécules destinées à inhiber le système NER pour potentialiser l'activité des agents alkylants et platinants est à l'ordre du jour. Un alkylant particulier, la trabectadine ou ET-743, qui cible l'amine en 2 de la guanine, interfère notamment avec le NER : ce composé est, au contraire des agents classiques, d'autant plus actif que le niveau d'activité NER est élevé, sans doute parce qu'il stimule une activité NER futile. Son association avec le cisplatine dans des cancers comme les carcinomes ovariens pourrait se révéler synergique.

Recombinaison homologue (Homologous recombination repair, HRR)

Ce mécanisme (fig. A-13) est mis en jeu pour réparer les coupures double brin de l'ADN, en particulier celles créées par les radiations ionisantes. Il est mis en jeu après reconnaissance des lésions par des kinases jouant un rôle de « senseur » des lésions : ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad-3 related*). Ces molécules sont susceptibles de reconnaître et de phosphoryler de nombreuses protéines : certaines sont directement impliquées dans la réparation, comme l'histone H2AX ; d'autres, comme CHK1 et CHK2 (pour *Checkpoint 1* et 2), sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (chapitre 17) ; d'autres encore, comme MDM2 (*Murine double minute homolog 2*), dans l'apoptose (chapitre 18). La recombinaison homologue est un phénomène assez lent, car il utilise le chromosome non endommagé pour servir de matrice et assurer une réparation fidèle de l'ADN. Un complexe protéique, appelé MRN car constitué des trois protéines MRE11 (*Meiotic recombination homolog 11*), RAD50 (*Radiation response yeast homolog 50*) et NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) ou nibrine, est activé par phosphorylation par ATM et exerce une activité 3' exonucléasique. Une série de protéines, RAD51, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2 (*Breast cancer protein 1 et 2*), sont impliquées dans la resynthèse de l'ADN lésé, qui est obtenue en recopiant la séquence homologue sur la chromatide sœur. Cette resynthèse, induite à partir des extrémités 3' de chaque brin, s'étend au-delà de la lésion et la restauration des fragments d'ADN originaux est permise par une enzyme spécifique appelée résolvase. Les mutations de *BRCA1* et *BRCA2* sont rencontrées dans une proportion importante de cancers du sein à prédisposition héréditaire.

Recombinaison non homologue (Non-homologous end joining, NHEJ)

Dans cette réparation des cassures double brin (fig. A-14), il y a une simple réassociation des extrémités séparées par la cassure. Ce processus est peu fidèle, car il peut introduire des délétions ponctuelles, mais c'est le principal mécanisme de réparation des cassures double brin chez l'homme. Les extrémités séparées sont reconnues par un complexe constitué de deux protéines, KU70 ou (XRCC6) et KU80 (ou XRCC5) et d'une autre kinase, la DNAPKcs (*DNA related protein kinase, catalytic subunit*) qui active par phosphorylation une 3' exonucléase appelée Artemis ou DCLRE (*DNA cross-link repair*), qui prépare les extrémités coupées avant que la ligase 4 (LIG4), asso-

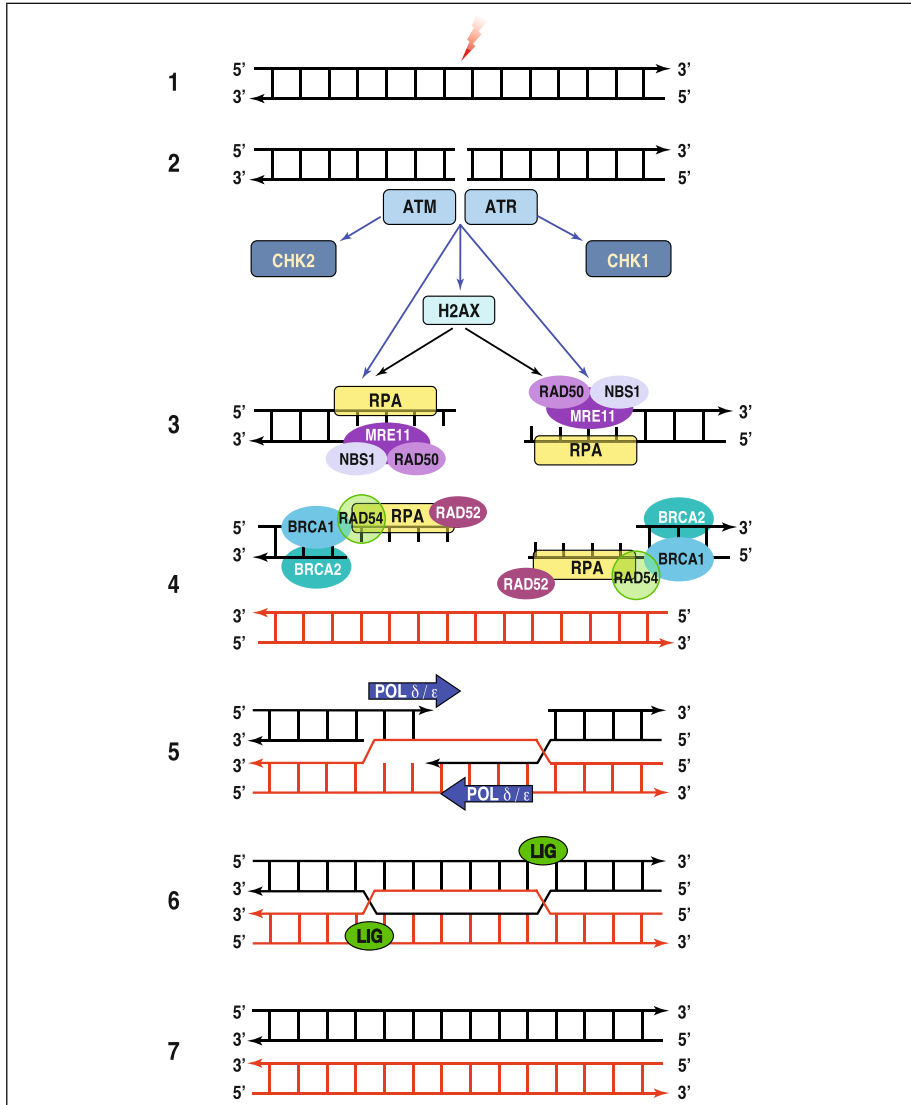


Fig. A-13 – Recombinaison homologue (HRR).

La formation de cassures double brin de l'ADN est détectée par des protéines senseurs de la famille des PIKK, ATM et ATR, qui phosphorylent un certain nombre de protéines effectrices, parmi lesquelles les kinases CHK1 et CHK2, qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire (chapitre 17), l'histone H2AX qui joue un rôle essentiel dans le remodelage de la chromatine après endommagement de l'ADN, et le complexe MRN (MRE11, RAD50 et NBS1), qui exerce une activité 3' exonucléasique. Il se produit une résection des extrémités de l'ADN au niveau de la cassure. Une série de protéines, RAD51, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2 (*Breast cancer protein 1 et 2*) sont impliquées dans la resynthèse de l'ADN lésé, qui est obtenue en recopiant la séquence homologue sur la chromatide sœur, et une « invasion de brin » permettant d'induire la nouvelle synthèse en se servant du chromosome intact comme matrice. Cette voie, bien que complexe, minimise le nombre d'erreurs.

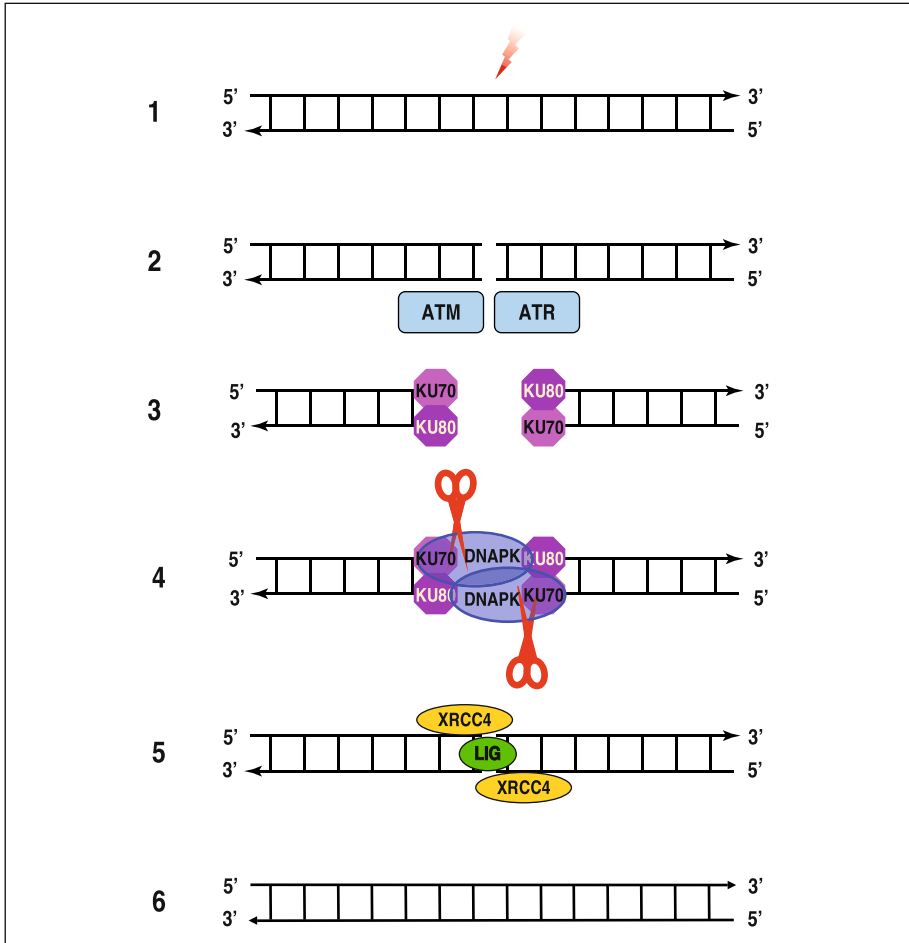


Fig. A-14 – Recombinaison non homologue (NHEJ)

Cette autre voie de recombinaison, majoritaire chez l'homme, est aussi appelée recombinaison par jonction d'extrémités ou *end joining*. Elle consiste à raccorder les extrémités de la cassure et implique essentiellement les protéines du complexe DNA-PK (KU70, KU80) associé à la nucléase Artémis qui prépare les extrémités à raccorder. Une ligase, associée à la protéine XRCC4, réalise alors ce raccordement. Cette voie est plus rapide mais génère des erreurs d'insertion ou de délétion de quelques bases.

ciée à une protéine XRCC4 et à un facteur XLF (*XRCC4 like factor*), ne vienne raccorder les deux extrémités séparées. Les défauts du NHEJ sont probablement liés à la survenue des anomalies chromosomiques qui caractérisent les hémopathies malignes (translocations, inversions, etc.).

L'inhibition des sérine/thréonine kinases de la famille PIKK (*Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase*) à laquelle appartiennent les kinases ATM, ATR et DNAPK, pourrait être un moyen de sensibiliser les cellules aux agents provoquant des cassures double brin de l'ADN, comme les inhibiteurs de topoisomérase II et les

radiations ionisantes. La wortmannine ou la caféine sont des composés peu sélectifs et actifs seulement à concentration élevée ; des agents plus sélectifs et plus actifs sont en cours d'étude. L'approche par ARN interférents ou par peptides à effet dominant négatif relève encore de l'expérimentation *in vitro*.

Les mécanismes de tolérance des lésions de l'ADN

Les procaryotes comme les eucaryotes ont développé des mécanismes de tolérance des lésions de l'ADN, moins coûteux en énergie que leur réparation. Ils consistent en particulier chez les mammifères en une série d'ADN polymérases translésionnelles, chacune spécialisée dans le franchissement d'un type de liaison : ADN polymérase η (POLH) pour les dimères de thymine créés par les UV, ADN polymérase ι (POLI) pour les dommages oxydatifs, ADN polymérase κ (POLK) pour les adduits aromatiques, ADN polymérase θ (POLQ) pour les sites abasiques, etc., certaines étant par ailleurs utilisées pour la resynthèse de l'ADN après réparation. Ces polymérases sont fortement mutagènes et la synthèse translésionnelle est utilisée par les tumeurs pour accroître leur niveau d'instabilité génomique. Leur expression est souvent altérée dans les cancers, tantôt diminuée (altérant en conséquence la synthèse réparatrice de l'ADN) et tantôt augmentée (favorisant alors l'accumulation de mutations). Des hélicases peuvent également participer à la synthèse translésionnelle d'ADN.

Le rôle des poly(ADP-ribose) polymérases

Les poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) constituent une famille de sept enzymes impliquées dans la régulation d'un grand nombre de processus incluant la transcription, la progression du cycle cellulaire, la mort cellulaire et la réparation de l'ADN. Les PARP catalysent la fixation, sur les résidus d'acide glutamique de protéines nucléaires, de polymères d'ADP-ribose provenant de l'hydrolyse du NAD⁺ qu'elles catalysent également (fig. A-15). Deux d'entre elles, PARP1 et PARP2, sont activées par la présence de dommages de l'ADN et jouent un rôle de senseur de ces lésions et de signalisation. PARP1 est capable de se lier aux extrémités des cassures double brin de l'ADN lors de leur réparation par recombinaison homologue ou non homologue ou lors de l'incision des sites abasiques par les endonucléases du BER ; PARP2 interagit avec PARP1 en s'associant à leurs partenaires communs. De nombreuses protéines ayant un rôle direct dans la réparation de l'ADN ou dans la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN sont des substrats de l'activité de PARP1 : ATM, p53, KU70, KU80, DNAPK, XRCC1, MRE11, POLB, LIG3, TOP1, etc. PARP1 est également capable de fixer des groupements poly(ADP-ribose) sur les histones, participant ainsi à la décondensation de la chromatine, et sur des facteurs de transcription comme NFkB. La poly(ADP-ribosyl)ation des protéines constitue une modification covalente post-traductionnelle qui apparaît fondamentale pour leur activité.

La découverte du rôle de PARP1 dans la réparation de l'ADN par le système BER a conduit au développement d'inhibiteurs dans le but de potentialiser l'action des

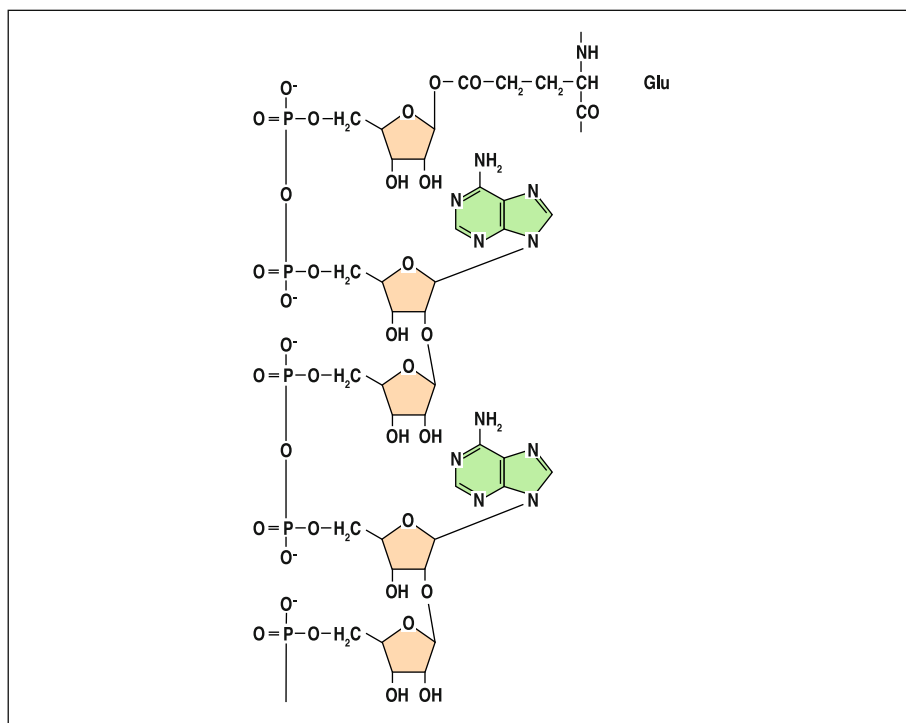


Fig. A-15 – Structure du poly(ADP-ribose)

Le poly(ADP-ribose) est constitué d'un enchaînement de molécules d'ADP liées entre elles par l'intermédiaire d'une molécule de ribose. Le premier ribose est lié à un résidu acide glutamique de la protéine par une liaison ester.

agents alkylants (fig. A-14). Dans le cas du témozolomide, les méthylations de l'adénine sur l'azote 3 ou de la guanine sur l'azote 7 sont rapidement réparées par le BER avec l'intervention de PARP1 et 2 et ne contribuent pas à sa cytotoxicité (fig. A-15). Si des inhibiteurs de PARP sont associés au témozolomide, le BER est inhibé et il s'ensuivra une induction de la mort cellulaire indépendante de la méthylation de la guanine sur l'oxygène 6. De la même façon, ces composés sont susceptibles de potentialiser l'action des radiations ionisantes, productrices de coupures double brin, ou des inhibiteurs de topoisomérase I, générateurs eux aussi de coupures double brin lors du passage d'une fourche de réplication sur un complexe de clivage. Une autre utilisation potentielle des inhibiteurs de PARP se situe au niveau des tumeurs ayant une déficience dans les mécanismes de réparation des coupures double brin : c'est le cas des cancers du sein ou de l'ovaire présentant une mutation invalidante des gènes *BRCA1* ou *BRCA2*.

Le 3-aminobenzamide a été la première molécule identifiée comme inhibiteur de PARP1. D'autres inhibiteurs plus spécifiques ont été développés. Ils appartiennent aux familles des isoquinolines, des benzoxazoles, des benzimidazoles et des quinazolinones, avec une activité très supérieure à celle des benzamides. Citons l'AG14361,

capable de potentialiser l'action anti-proliférative du témozolomide, des radiations ionisantes et du topotécan, un inhibiteur de topoisomérase I, ainsi que l'olaparib (AZD2281), en cours d'essais dans les cancers du sein BRCA^{-/-}.

La protection de l'extrémité des chromosomes

Télomères et télomérase

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques destinés à protéger l'extrémité des chromosomes de l'attaque des exonucléases et des recombinaisons accidentelles qui pourraient se produire et altérer l'information génomique. À chaque génération cellulaire, une partie de l'ADN télomérique est éliminée et ce raccourcissement progressif des chromosomes explique pourquoi les lignées cellulaires normales ne peuvent accomplir qu'un nombre limité de divisions. Lorsque ce potentiel réplicatif est épuisé, la perte complète des télomères conduit d'une part à des fusions chromosomiques létales et d'autre part à des signaux de sénescence entraînant la mort de la cellule. Dans les tissus germinaux comme au cours de l'embryogenèse, il existe une régénération des télomères après chaque cycle de réplication, qui maintient ainsi intact le potentiel réplicatif. Cela est assuré par une enzyme appelée télomérase dont l'activité et/ou l'expression est nulle dans les tissus somatiques adultes, mais qui est réactivée dans plus de 80 % de tumeurs.

Les télomères présentent une structure caractéristique, faite de la répétition d'une séquence de six nucléotides (5' TTAGGG 3') plusieurs milliers de fois. Ils s'étendent de 6 à 8 kb dans les cellules somatiques, et de 10 à 20 kb dans les cellules germinales. Les deux cents derniers nucléotides constituent un simple brin replié sur lui-même pour constituer une « boucle T » en lasso avec, à l'extrémité 3', une hybridation avec un segment complémentaire antérieur pour former une « boucle D » (fig. A-16). Plusieurs protéines sont associées à ces boucles : TRF1 et TRF2 (pour *Telomere repeat binding factor*), TIN2 (*TRF1-interacting protein 2*), RAP1 (*Transcriptional repressor/activator protein*), POT1 (*Protection of telomeres 1*) et TPP1 (*TIN2 and POT1-organizing protein*) (fig. A-16). TRF1, TRF2 et POT1 sont liés avec les structures télomériques en double brin et sont interconnectés par les autres protéines. TRF1 et TRF2 interagissent également avec la PARP (*Poly(ADP-ribose)polymerase*) et avec une enzyme appelée tankyrase (TNKS), ainsi qu'avec des protéines de réparation de l'ADN, le complexe MRE11-RAD50-NBS1, l'hétérodimère KU70/KU80 et la protéine ATM. L'ensemble constitue une véritable organelle à l'extrémité des chromosomes, appelée télosome ou shelterine. Le rôle exact de chacune des protéines constituant cette organelle n'est pas connu avec précision.

Le télosome permet aux télomères d'exister sous deux états distincts : une forme bloquée (*capped*) dans laquelle l'ADN est inaccessible aux exonucléases et aux opérations de réparation ou de recombinaison, ainsi qu'à la télomérase, et une forme ouverte (*uncapped*) permettant à la télomérase de reconstituer la partie perdue lors du cycle de réplication précédent. Par ailleurs, les télomères semblent exister sous une

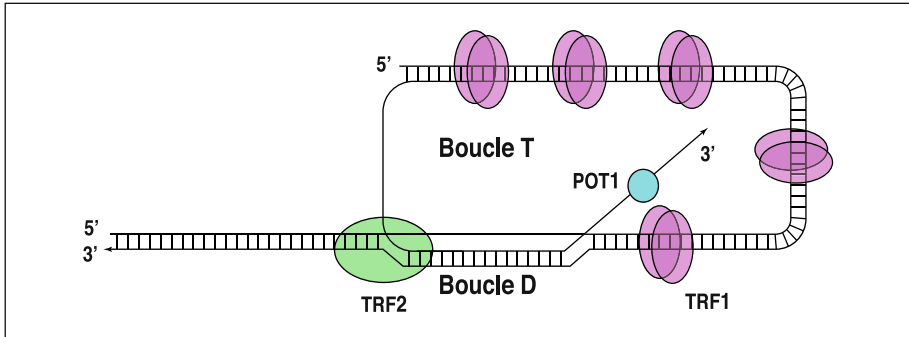


Fig. A-16 – Structure des télomères.

Les télomères présentent une structure caractéristique, faite de la répétition d'une séquence de six nucléotides (5' TTAGGG 3') plusieurs milliers de fois. Les 200 derniers nucléotides constituent un simple brin replié sur lui-même pour constituer une « boucle T » en lasso avec, à l'extrémité 3', une hybridation avec un segment complémentaire antérieur pour former une « boucle D ». Plusieurs protéines sont associées à ces boucles, formant les complexes TRF1 et TRF2.

seconde forme distincte, peut-être interconvertible avec la première, dans laquelle l'extrémité simple brin du télomère est organisée de façon à former des tétramères de guanine plans, les guanines interagissant par des liaisons hydrogène distinctes des appariements classiques de type Watson et Crick (fig. A-17). Ces « G-quadruplex » forment une structure compacte résistante aux exonucléases.

La télomérase est un corpuscule ribonucléoprotéique dimérique comprenant un ARN de 451 nucléotides, appelé hTR (*Human Telomerase RNA*), dont une séquence de douze nucléotides va servir de matrice à la reconstitution du télomère, une protéine de 170 kDa à fonction de rétrotranscriptase (ADN polymérase ARN-dépendante) appelée hTERT (*Human telomerase reverse transcriptase*) et une protéine non enzymatique associée appelée dyskérine (DKC1). La sous-unité catalytique de la télomérase a pour rôle de catalyser la polymérisation des nucléotides incorporés à l'extrémité des chromosomes. Ces sous-unités s'associent pour former un tétramère composé de deux sous-unités d'ARN matricielles (hTR) et de deux sous-unités catalytiques (hTERT). Elle fonctionne en recopiant par groupes de six nucléotides la matrice d'ARN pour allonger l'ADN amputé dans le sens 5' → 3' et en se décalant à chaque reprise d'une longueur égale (fig. A-18). La télomérase est régulée chez l'homme pendant le développement embryonnaire grâce au contrôle transcriptionnel d'hTERT, qui est le composé limitant de l'activité enzymatique. Il a été établi qu'hTERT est soumis à un épissage alternatif et qu'il existe une variante appelée hTERTa qui exerce une inhibition dominante négative de l'activité de la télomérase.

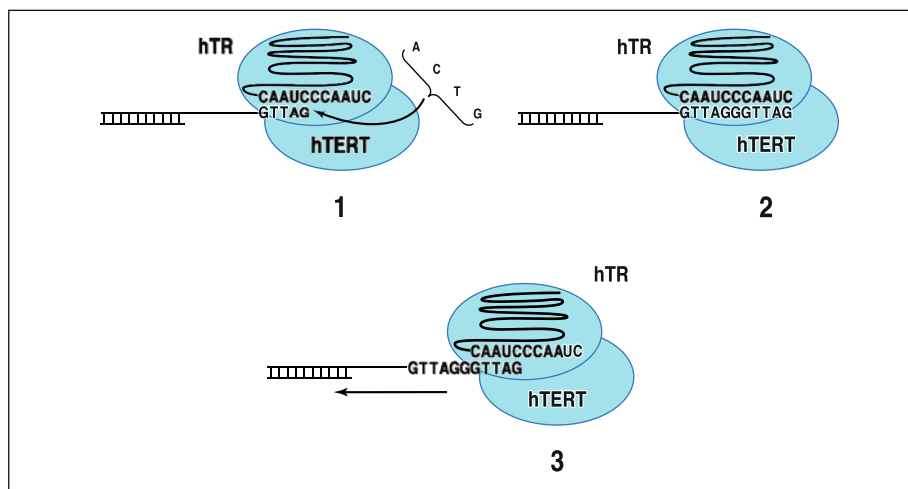


Fig. A-17 – Les structures en quadruplex.

L'extrémité simple brin des télomères peut être organisée de façon à former des tétramères de guanines plans, les guanines interagissant par des liaisons hydrogène distinctes des appariements classiques de type Watson et Crick. Ces « G-quadruplex » forment une structure compacte résistante aux exonucléases et inaccessible à la télomérase.

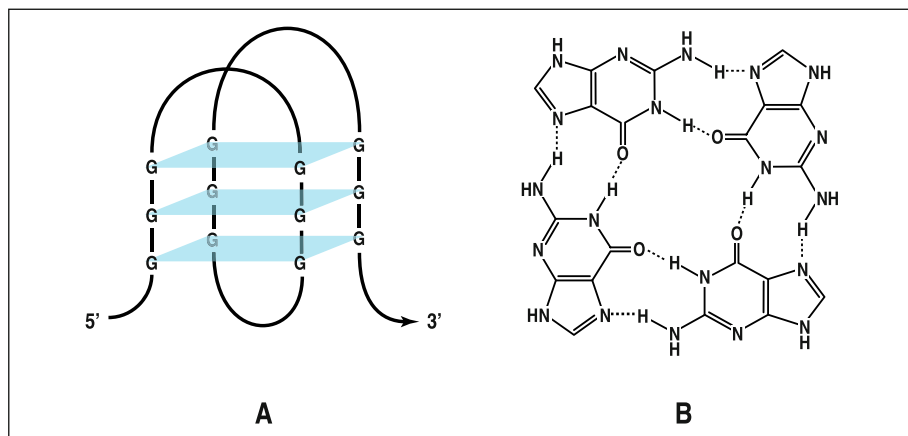


Fig. A-18 – Mécanisme d'action de la télomérase.

La télomérase est une structure ribonucléoprotéique comprenant (1) un ARN (hTR), dont une séquence de 12 nucléotides sert de matrice à la reconstitution du télomère; (2) une protéine de 170 kDa à fonction de rétrotranscriptase (hTERT); (3) une protéine non enzymatique appelée dyskérine (DKC1). La sous-unité catalytique de la télomérase catalyse la polymérisation des nucléotides incorporés à l'extrémité des chromosomes, en recopiant par groupes de 6 nucléotides la matrice d'ARN pour allonger l'ADN amputé, dans le sens 5' → 3' et en se décalant à chaque reprise d'une longueur égale.

Altérations oncogéniques et ciblage pharmacologique

La réactivation d'une activité télomérase dans les cellules constitue un moyen essentiel pour assurer l'immortalité des lignées cancéreuses tumorales et 85 % des cellules cancéreuses présentent une telle réactivation. Un deuxième mécanisme de maintien des télomères, indépendant de la télomérase, a été décrit dans les tumeurs et implique une recombinaison homologue : il a reçu le nom d'ALT (*Alternative lengthening of telomeres*). La réexpression d'hTERT constitue une étape critique de la transformation néoplasique. De plus, l'inhibition de la télomérase provoque l'entrée en apoptose ou en sénescence de la plupart des lignées cellulaires cancéreuses.

Les télomères et la télomérase ont ainsi été proposés comme des cibles intéressantes dans le développement de stratégies thérapeutiques anticancéreuses nouvelles. Ce ciblage peut être envisagé à plusieurs niveaux :

- *au niveau de l'activité télomérase* : par inhibition de son activité catalytique (inhibiteurs de l'activité rétrotranscriptase par des dérivés nucléosidiques ou autres) ;
- *au niveau de l'expression de la télomérase* : par des approches antisens dirigées contre hTERT ou contre hTR ou par altération des modifications post-traductionnelles qu'elle doit subir ;
- *par immunothérapie active* : stimulation de cellules immunocompétentes contre les cellules exprimant la télomérase ;
- *par thérapie génique* : en insérant un gène suicide en aval du promoteur de la télomérase ;
- *au niveau des protéines du télosome* : essentiellement par des approches utilisant des molécules antisens ;
- *au niveau du télomère lui-même* : par utilisation de molécules susceptibles d'interférer avec les G-quadruplex et de les stabiliser ; ce sont généralement à des structures planes susceptibles de s'insérer que l'on s'adresse.

Bibliographie

Organisation du génome, machinerie de la réplication

- Bell SP, Dutta. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*; 71: 333-74.
- Davey MJ, O'Donnell M. (2000) Mechanisms of DNA replication. *Curr Opin Chem Biol*; 4: 581-6.
- Étienne J, Clauser E, Housset C, Roingeard P. (2006) *Biochimie génétique, biologie moléculaire*. Masson, Paris; 294 p.
- Johnson A, O'Donnell M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annu Rev Biochem*; 74: 283-315.
- Weil JH. (2001) *Biochimie générale*, 9^e édition. Dunod, Paris; 655 p.

Réparation de l'ADN

- Bolderson E, Richard DJ, Zhou BB, Khanna KK. (2009) Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clin Cancer Res*; 15: 6314-20.
- Branzei D, Foiani M. (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9: 297-308.

- Cleaver JE, Lam ET, Revet I. (2009) Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet*; 10: 756-68.
- Gari K, Constantinou A. (2009) The role of the Fanconi anemia network in the response to DNA replication stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 44: 292-325.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C *et al.* (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 8: 193-204.
- Hoeijmakers JH. (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*; 361: 1475-85.
- O'Connor MJ, Martin NM, Smith GC. (2007) Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair. *Oncogene*; 26: 7816-24.
- Pourquier P. (2006) La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bull Cancer*; 93 (hors-série) 124-44.
- Prakash S, Johnan RE, Prakash L. (2005) Eukaryotic translation synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annu Rev Biochem*; 74: 317-53.
- Schärer OD. (2003) Chemistry and Biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed*; 42: 2946-74.
- Shrivastav N, Li D, Essigmann JM. (2010) Chemical biology of mutagenesis and DNA repair : cellular response to DNA alkylation. *Carcinogenesis*; 31: 59-70.

Poly(ADP-ribosyl)ation

- Jagtap P, Szabo C. (2005) Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*; 4: 421-40.
- Fong PC, Boss DS, Yap TA *et al.* (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*; 361: 123-34.

Télomères et télomérase

- Artandi SF, DePinho RA. (2010) Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*; 31: 9-18.
- Blasco MA. (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*; 6: 611-22.
- Blasco MA. (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*; 3: 640-9.
- Deng Y, Chan SS, Chang S. (2008) Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer*; 8: 450-8.
- Folini M, Gandellini P, Zaffaroni N. (2009) Targeting the telosome: therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta*; 1792: 309-16.
- Harley CB. (2008) Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*; 8: 167-79.
- Shay JW, Wright WE. (2006) Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 577-84.

Annexe B

Le contrôle de l'expression des gènes

Introduction

Cette annexe est destinée à approfondir la compréhension des voies de transduction des signaux en décrivant les moyens par lesquels les cellules contrôlent l'expression des gènes, c'est-à-dire la quantité d'ARN messager (ARNm) mis à la disposition de la synthèse des protéines. La plupart des signaux que reçoivent les cellules aboutissent à des modifications de l'expression des gènes : nous avons vu en effet que de nombreuses voies de signalisation se terminent, dans le noyau, par la mise en route ou l'inhibition de la transcription de gènes spécifiques. Il nous est apparu nécessaire de décrire de façon simple les règles générales qui président à la transcription du génome, d'autant plus que ces mécanismes mêmes, en aval des voies de signalisation, peuvent présenter des altérations oncogéniques et que l'on peut y trouver des cibles pharmacologiques. Par ailleurs, nous avons souvent évoqué le « contexte cellulaire » sans trop le définir, en décrivant par exemple les effets opposés que peuvent entraîner les mêmes protéines de signalisation dans des circonstances différentes. Ce « contexte cellulaire », on peut dire que c'est l'état d'une cellule à un instant donné, dans le temps et dans l'espace : son niveau de différenciation, sa situation topologique dans le tissu et dans l'organisme, ses interactions avec d'autres cellules, etc. Cela peut être représenté, sans être trop réductionniste, par la collection des gènes qu'elle exprime à cet instant donné. Là encore, nous avons besoin de comprendre comment se fait la régulation de l'expression des gènes pour comprendre l'aboutissement des voies de signalisation.

Nous présenterons brièvement la machinerie de la transcription, telle qu'elle est décrite dans les ouvrages fondamentaux de biologie moléculaire auxquels nous renvoyons le lecteur pour plus de détails. Nous aborderons ensuite les grands mécanismes qui contrôlent cette transcription et les variables génétiques ou épigénétiques qui modifient les produits des gènes, en nous arrêtant régulièrement sur les perturbations rencontrées dans les cancers et sur les solutions que pourrait apporter la pharmacologie à ces perturbations. Pour l'étude individuelle de facteurs de transcription, nous renvoyons le lecteur aux chapitres spécifiques dans lesquels leur mise en jeu et leur rôle ont été décrits.

La machinerie de la transcription

La synthèse d'ARNm résulte de l'activité enzymatique des ARN polymérases. Elle déroule dans le sens $5' \rightarrow 3'$, utilise comme substrats les quatre ribonucléosides triphosphates ATP, UTP, CTP, GTP et crée des liaisons phosphodiester entre l'extrémité $3'\text{OH}$ libre de la chaîne en cours d'élongation et l'extrémité $5'$ phosphate d'un nouveau nucléotide (fig. B-1). La séquence des nucléotides de l'ADN détermine celle de l'ARNm : la synthèse d'ARN se déroule en effet après ouverture de la molécule d'ADN par des enzymes spécialisées ; chaque nucléotide du brin d'ARN synthétisé est complémentaire de celui présent sur le brin d'ADN matriciel recopié avec remplacement de la thymine par l'uracile. Selon le gène, la transcription s'effectue sur un brin d'ADN ou sur l'autre. Le brin recopié, de séquence complémentaire à celle de l'ARN, est le brin antisens (-) ; l'autre, de séquence identique à celle de l'ARN synthétisé, est le brin sens (+) (fig. B-2).

Comme nous l'avons vu précédemment, la structure des gènes est discontinue chez les eucaryotes ; les séquences codantes (exons) sont interrompues par des

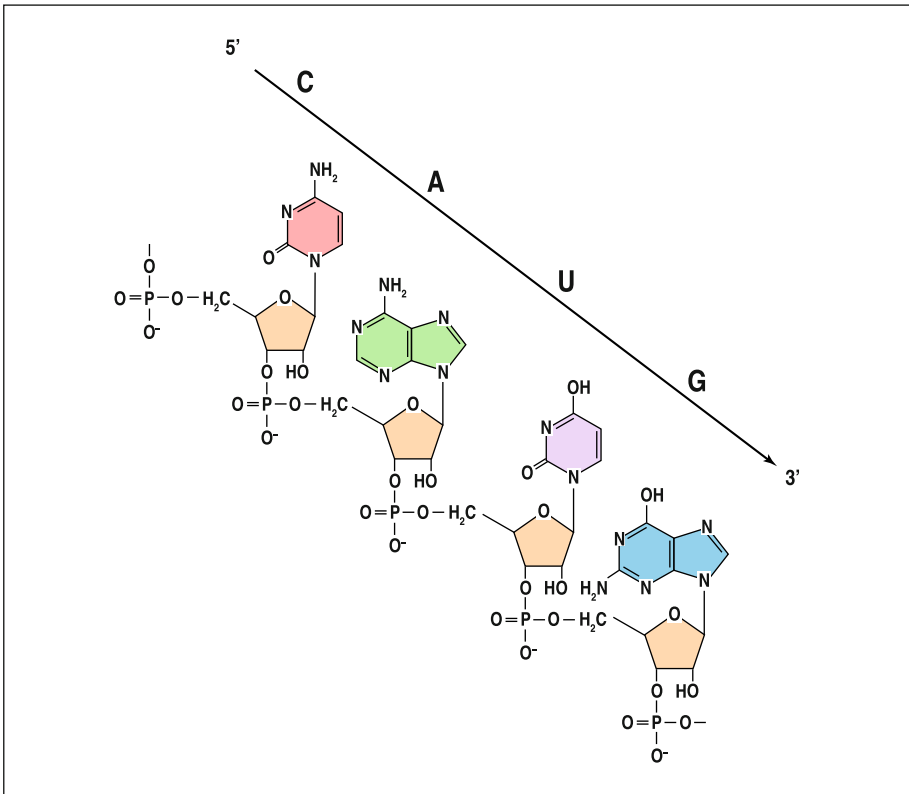


Fig. B-1 – Structure d'un fragment d'ARN.

Exemple de l'enchaînement des nucléotides CAUG d'un ARN messager. La synthèse s'effectue de $5'$ en $3'$.

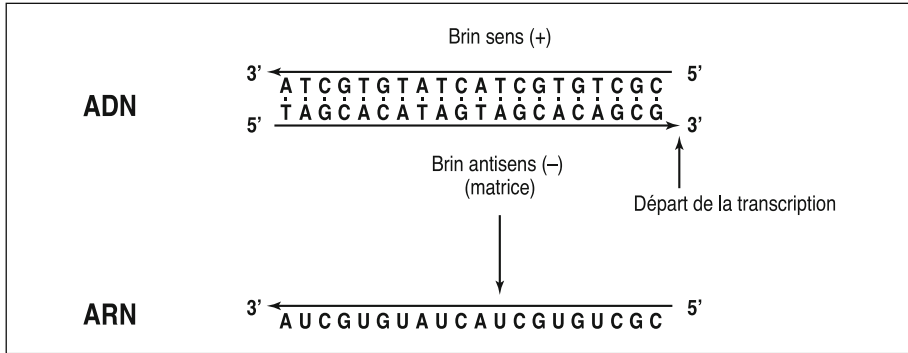


Fig. B-2 – Synthèse de l'ARN (transcription)

La synthèse s'effectue de 5' en 3' en copiant le brin d'ADN matrice appelé brin antisens ou brin (-). L'ARN aura la séquence du brin sens ou brin (+), avec remplacement des T par des U.

séquences non codantes (introns). La transcription d'un gène codant pour une protéine commence en amont (5') du premier exon codant, comprend tous les exons et tous les introns, et se termine en aval du dernier exon (3'). À l'issue de cette étape de transcription, les ARN messagers primaires sont maturés, les introns sont excisés par épissage et l'ARN messenger ne contient plus qu'une séquence codante correspondant au rapprochement des exons, qui sera traduite en protéine, ainsi que des séquences non traduites en 5' et en 3'. En amont du site d'initiation de la transcription se trouve le promoteur du gène, site de fixation de l'ARN polymérase, qui détermine quel brin d'ADN sera copié ; dans son voisinage se trouvent également un ensemble de séquences caractéristiques permettant la fixation de protéines appelées facteurs de transcription, en particulier une séquence appelée *TATA box* située 25 nucléotides en amont du site d'initiation, mais inconstante car présente uniquement dans les gènes « de ménage ».

Une série de complexes protéiques nommés TFIIA, B, D, E, F, H et J (*Transcription factor IIA*, etc.) est nécessaire à l'initiation de la transcription, outre l'enzyme (ARN polymérase II, POLR2), l'ADN matriciel et les substrats (fig. B-3). L'ensemble constitue le complexe d'initiation de la transcription ; l'un de ses composants contient une activité hélicase qui permet d'ouvrir la molécule d'ADN, c'est-à-dire de séparer les deux brins localement, en formant une boucle pour que soient reconnus les nucléotides à recopier ; un autre, une activité kinase pour phosphoryler et activer l'ARN polymérase II. La transcription commence 25 nucléotides en aval de la *TATA box* quand elle existe et se poursuit en recopiant le brin antisens ; l'ARNm synthétisé se détache progressivement de la double hélice d'ADN. Des séquences caractéristiques signalant la terminaison de la transcription, situées en aval de la séquence codante du gène sont reconnues par l'ARN polymérase qui arrête la transcription et se détache de l'ADN ; l'ARNm synthétisé se détache alors de l'ensemble.

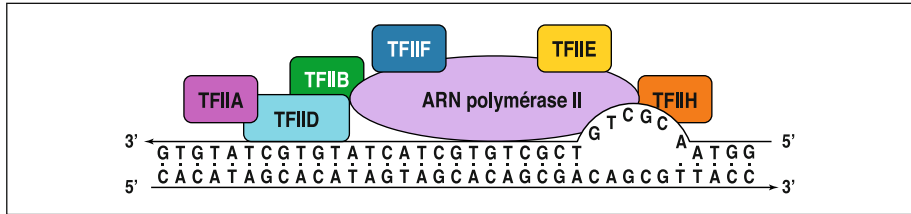


Fig. B-3 – Le complexe de transcription.

Le travail de l'ARN polymérase II n'est possible qu'en présence d'un certain nombre de complexes protéiques appelés TFIIA, B, D, E, F et H. Le complexe TFIIH contient une activité hélicase permettant de dérouler la double hélice et la rendre accessible à l'ARN polymérase. Certaines des protéines constitutives de ces complexes sont des kinases, d'autres des petites protéines G.

L'ARNm subit une série de modifications en cours de synthèse et après celle-ci :

- il est muni en cours de synthèse d'une « coiffe » (fig. B-4) destinée à protéger son extrémité 5' et à assurer sa reconnaissance par le système de traduction ; le phosphate γ du nucléotide initial est hydrolysé ; une molécule de GTP y est fixée par son extrémité 5', créant une liaison entre deux phosphates en 5' ; un groupement méthyle est ajouté à la guanine sur l'azote 7. Il peut se produire également méthylation des fonctions 2'OH de certains nucléotides initiaux ;
- il est muni après synthèse d'une « queue poly(A) » (fig. B-5) grâce à une poly(A) polymérase qui ajoute, du côté 3', une série de nucléotides adényliques, allant jusqu'à mille et au-delà. Cette queue est progressivement réduite au cours de la maturation des ARNm. Cette « queue poly(A) » peut servir à séparer les ARN messagers de la masse des autres ARN cellulaires ;
- il subit l'ablation de ses introns, par une opération appelée « épissage » (*splicing*). L'épissage est réalisé par un complexe ribonucléoprotéique, le spliceosome, qui reconnaît les nucléotides initiaux de l'intron $n+1$ (GU, site donneur), les nucléotides terminaux de l'intron n (AG, site receveur) et un nucléotide situé quarante nucléotides en amont du site receveur (A, site de branchement). La fonction endonucléase du complexe d'épissage permet l'excision de l'intron, qui est éliminé sous forme d'un lasso, et le raccordement de l'extrémité 3' de l'exon d'amont à l'extrémité 5' de l'exon d'aval (fig. B-6).

L'ARN ainsi mûré peut migrer dans le cytoplasme ; il ne contient plus que la séquence à traduire (voir Annexe C). Le taux de transcription de l'ADN, le degré de stabilité de l'ARNm et l'existence de variations dans le raccordement des exons après épissage (épissage alternatif) constituent des points importants dans la régulation de l'expression des gènes, que nous décrirons dans ce chapitre.

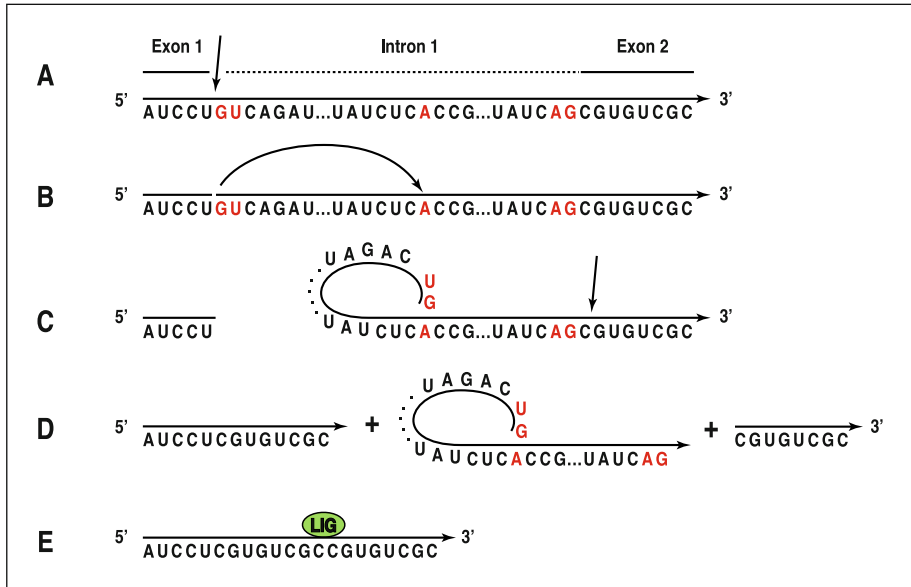


Fig. B-6 – Mécanisme de l'épissage.

Les introns sont caractérisés par la présence à leur extrémité 5' d'un site « donneur » GU, à leur extrémité 3' d'un site « receveur » AG et par l'existence d'un point de branchement A, situé 40 nucléotides en amont du site receveur. L'épissage est réalisé par un complexe ribonucléo-protéique, le spliceosome, qui reconnaît ces signaux caractéristiques. Il se produit l'excision de l'intron à son extrémité 5' (A), le repliement de l'ARN (B), le raccordement de cette extrémité au point de branchement et l'excision de l'intron à son extrémité 3' (C), l'élimination de l'intron sous forme d'un lasso, et le raccordement de l'extrémité 3' de l'exon d'amont à l'extrémité 5' de l'exon d'aval (D).

Le contrôle de la transcription

La transcription des gènes est contrôlée par des protéines régulatrices, synthétisées à partir d'autres gènes (séquences régulatrices en *trans*), et reconnaissant de courtes séquences d'ADN à l'intérieur ou à proximité du gène (d'où leur nom de régulateur en *cis*). Des centaines de séquences régulatrices différentes ont été identifiées dans le génome, chacune pouvant être reconnue par une ou plusieurs protéines régulatrices. Ces séquences régulatrices portent souvent un nom terminé par RE (*Responsive element*) comme le CRE (*cAMP responsive element*, chapitre 6) ou les HRE (*Hormone responsive element*) qui reconnaissent les récepteurs nucléaires liés à leur ligand (chapitre 14). Les protéines régulatrices possèdent un domaine de reconnaissance et de liaison à l'ADN, généralement au niveau du grand sillon où se trouvent des groupements libres non engagés dans la complémentarité inter-brins, et un domaine de régulation de la transcription. Il existe des motifs caractéristiques au niveau des domaines de reconnaissance de l'ADN, que l'on retrouve dans chaque classe de

protéines régulatrices : ce sont les motifs hélice-boucle-hélice (HLH, *Helix-loop-helix*), les doigts de zinc (*Zinc finger*) et les fermetures Éclair à leucines (*Leucine zipper*). Ces protéines régulatrices sont souvent des dimères ; les facteurs de transcription constituent la variété la plus importante de protéines régulatrices.

Le motif hélice-tour-hélice est fait de deux hélices α perpendiculaires reliées par un tour β . L'une des hélices est insérée dans le grand sillon et établit des contacts avec les atomes réactifs des bases. Les doigts de zinc sont constitués d'un repliement de la chaîne peptidique autour d'un ion Zn^{2+} qui se lie par coordinence avec deux cystéines d'une part et deux histidines d'autre part. Plusieurs doigts de zinc consécutifs permettent à la protéine de s'enrouler en spirale autour de l'ADN, nouant des contacts entre une hélice α et le grand sillon. Une variante existe dans les récepteurs nucléaires, où deux hélices α sont séparées par un domaine où un ion Zn^{2+} est lié par coordinence à quatre cystéines. Enfin, les *leucine zippers* mettent en contact les extrémités C-terminales hydrophobes (riches en leucine) de deux protéines pour former un homo- ou un hétérodimère, les hélices α s'enroulant l'une autour de l'autre, la liaison avec l'ADN se faisant au niveau N-terminal de l'hélice, dans le grand sillon de l'ADN (fig. B-7).

Les protéines régulatrices peuvent interagir avec le promoteur du gène, situé quelques dizaines de nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription ; elles peuvent également agir en amont, en aval, ou à l'intérieur de la région transcrite, mais parfois à plusieurs milliers de nucléotides du site d'initiation de la transcription, grâce à un repliement de la chaîne d'ADN. Ces protéines peuvent être des activateurs (reconnaissant des séquences *enhancer*) ou des répresseurs (reconnaissant des séquences *silencer*). Les protéines activatrices intervenant directement au niveau du site d'initiation de la transcription facilitent cette initiation en favorisant l'action des divers facteurs TFII sur le promoteur, les protéines répressives peuvent

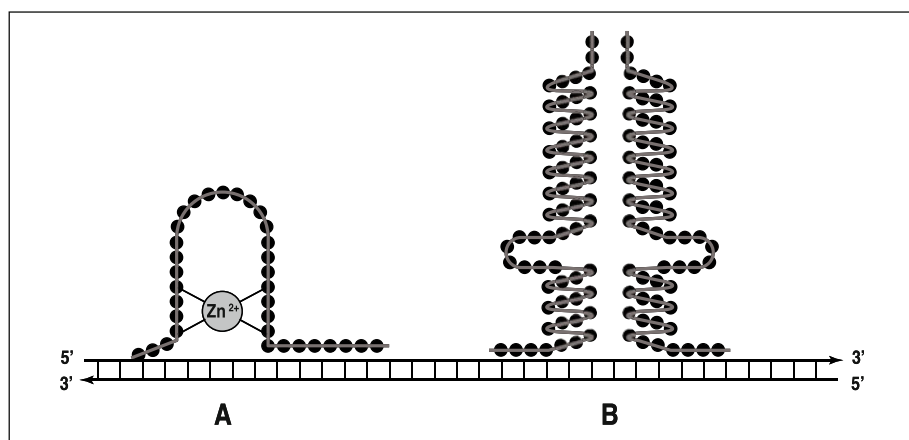


Fig. B-7 — Structures de reconnaissance de l'ADN.

Les facteurs de transcription possèdent des motifs protéiques précis leur permettant de reconnaître des séquences spécifiques de l'ADN, en particulier au niveau des promoteurs.

A : Structure en doigt de zinc ; **B** : structure hélice – boucle – hélice.

agir en se liant au site de fixation de l'ARN polymérase pour empêcher son action, ou en prenant la place des protéines activatrices. De nombreux cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs) peuvent interagir avec les protéines régulatrices. La régulation de la transcription fait intervenir en outre des facteurs capables de remodeler la chromatine en modifiant les histones (voir p. 272). Tous ces facteurs de régulation sont des produits de gènes dont la transcription est régulée par d'autres facteurs, et ils peuvent subir des modifications post-traductionnelles capables de les activer ou de les désactiver (voir Annexe C). On mesure ainsi la complexité et la finesse de la régulation de la transcription.

La transcription aboutit ainsi à la synthèse des messagers qui vont présider à la synthèse des protéines. Il est possible depuis une dizaine d'années d'obtenir une image instantanée de la quantité relative de chaque transcrit présent dans une population cellulaire ou un tissu à un instant donné ; cela a été rendu possible par la connaissance complète du génome, par les progrès de la biologie moléculaire et des microtechnologies, et par les possibilités informatiques de l'analyse à haut débit. La cancérologie s'est particulièrement intéressée à ces *microarrays* d'ADN, qui permettent de comparer tumeur et tissu sain, tumeur primitive et métastase, tumeur sensible au traitement et tumeur résistante, etc. À partir des profils d'expression, il a été ainsi possible d'établir des *signatures moléculaires* caractéristiques d'un état cellulaire donné, signatures généralement plus faciles à établir qu'à interpréter. La classification nosologique des cancers, la probabilité de récurrence métastatique, la prédiction de la réponse au traitement sont les champs principaux où ces *microarrays* peuvent aider l'oncologue à affiner un diagnostic, à établir un pronostic, à adapter un traitement. De nombreux travaux de validation clinique sont nécessaires avant de voir passer ces techniques dans la routine de la prise en charge des patients.

La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN sur les cytosines de la région promotrice constitue un mode important de régulation de l'expression des gènes. Elle permet de distinguer des gènes « actifs », c'est-à-dire transcrits, et des gènes « inactifs », non transcrits. Elle constitue un élément clé de la différenciation cellulaire : dans les tissus où une protéine ne doit pas s'exprimer, son gène subit une méthylation importante de son promoteur. Le profil d'expression des gènes reflète le taux de méthylation de leurs promoteurs. Cette méthylation est réalisée par des ADN méthyltransférases sur le carbone 5 de cytosines de certains doublets CG, généralement regroupés dans des régions de plusieurs dizaines de nucléotides appelés « îlots CpG ». Grâce à une ADN méthyltransférase « de maintenance », DNMT1 (DNA methyltransferase 1), la méthylation de ces cytosines se transmet de cellule mère à cellule fille comme si elle était génétique ; on dit qu'elle est « épigénétique ». La réplication ne peut incorporer dans l'ADN que des cytosines non méthylées ; c'est après la réplication que l'ADN méthyltransférase vient ajouter un méthyle sur la cytosine complémentaire de la guanine voisine de la cytosine méthylée du brin recopié (fig. B-8).

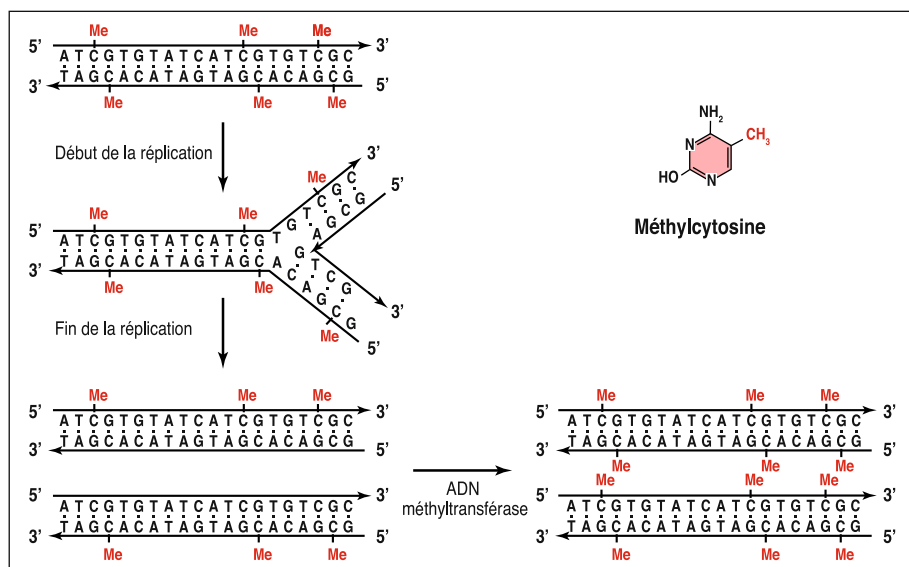


Fig. B-8 — Méthylation de l'ADN.

Dans les régions promotrices de nombreux gènes, les cytosines immédiatement en amont d'une guanine sont méthylées sur leur carbone 5 (encart). Grâce à une ADN méthyltransférase, la méthylation de ces cytosines se transmet de cellule-mère à cellule-fille comme si elle était génétique. La réplication ne peut incorporer dans l'ADN que des cytosines non méthylées ; c'est après la réplication que l'ADN méthyltransférase vient ajouter un méthyle sur la cytosine complémentaire de la guanine voisine de la cytosine méthylée du brin servant de matrice.

Les méthylcytosines d'un promoteur peuvent parfois inhiber directement la transcription en empêchant la reconnaissance des sites promoteurs par les facteurs de transcription. Plusieurs facteurs de transcription, comme AP2, MYC, CREB, E2F ou NFκB, reconnaissent des séquences contenant des îlots CpG et leur action est inhibée par la méthylation de ces derniers. Plus généralement, elles agissent également de façon indirecte, car elles sont reconnues par des protéines qui vont entraîner, par l'intermédiaire des histones, un remodelage de la chromatine et sa compaction ; ce sont les protéines de la famille MBD (*Methyl CpG-binding domain protein*). Cette compaction défavorise la reconnaissance du promoteur par les complexes de transcription et réduit considérablement le taux de transcription. À l'inverse, l'état de la chromatine va influencer les ADN méthyltransférases, et la désacétylation des histones s'accompagne d'une déméthylation de l'ADN. Il existe en somme des échanges d'information entre la chromatine et les ADN méthyltransférases, qui concourent à la régulation de l'expression des gènes.

Dans les cellules cancéreuses, il existe une hypométhylation globale de l'ADN, en particulier au niveau des séquences répétitives, et une hyperméthylation localisée à certains promoteurs, tout particulièrement ceux de gènes suppresseurs de tumeurs.

L'hypométhylation globale serait un facteur d'instabilité génique, et l'hyperméthylation localisée est certainement un des moyens de maintenir l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs à un taux faible ; elle constitue donc un facteur important dans l'oncogenèse. De nombreux gènes sont hyperméthylés, de façon généralement spécifique, dans les cancers ; parmi eux des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (CDKN2A ou p16^{INK4a}, CDKN1A ou p21^{CIP1}, RB1 [*Retinoblastoma protein 1*], chapitre 17), la réparation de l'ADN (BRCA1 [*Breast cancer 1*], MGMT [*Methylguanine methyltransferase*], MLH1 [*MutL homologue 1*], Annexe A), l'apoptose (DAPK [*Death-associated protein kinase*], chapitre 18), l'angiogenèse, la dissémination métastatique (cadhérine E, chapitre 7), les voies de signalisation (APC [*Adenomatous polyposis coli*], chapitre 7) etc. La méthylation du promoteur d'un gène de réparation de l'ADN, la MGMT, s'accompagne d'une absence de réparation des lésions créées par certains agents anticancéreux comme le témozolomide, ce qui potentialise leur activité.

Des agents pharmacologiques induisant une déméthylation de l'ADN ont été proposés et sont utilisés dans le traitement de certaines pathologies néoplasiques comme les syndromes myélodysplasiques. Ce sont des analogues de nucléosides, la 5-azacytidine, la décitabine (5-aza-2'-désoxycytidine) et la zébularine. Ces agents sont incorporés dans l'ADN, et ils bloquent la DNMT1 dans une liaison irréversible, l'empêchant de réaliser la méthylation « de maintenance » du génome lors la réplication. Il n'est pas exclu que la déméthylation de l'ADN qu'ils induisent puisse réactiver des oncogènes précisément réprimés par méthylation. D'autres molécules inhibitrices non nucléosidiques des ADN méthyltransférases sont à l'étude, ainsi que des molécules inhibitrices de la protéine MBD2. Par ailleurs, comme la méthylation de l'ADN peut réprimer la transcription *via* la désacétylation des histones, des agents inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) peuvent se comporter comme des agents déméthylants (voir paragraphe suivant).

Les histones et la structure de la chromatine

La chromatine (voir Annexe A) est constituée d'ADN, d'ARN et de protéines liées structuralement et fonctionnellement à l'ADN, essentiellement les histones, et elle participe de façon importante au contrôle de l'expression des gènes. Les motifs élémentaires de la chromatine sont les nucléosomes, qui sont faits d'un octamère d'histones : un tétramère H3-H4 entouré de deux dimères H2A-H2B, reliés entre eux par l'histone H1 (voir fig. A-4). La chromatine est présente dans le noyau sous forme condensée (hétérochromatine) au niveau des zones géniques non transcrites, et sous forme relâchée (euchromatine) dans les zones géniques activement transcrites (fig. B-9).

L'extrémité N-terminale des histones peut être modifiée par méthylation, acétylation et phosphorylation (voir Annexe C), générant des variants dont le profil crée une sorte de « code des histones », chaque histone possédant un « marquage » caractéristique (fig. B-10). Des facteurs d'activation ou de répression de la transcription recrutent des protéines de modification des histones (méthyltransférases et déméthylases,

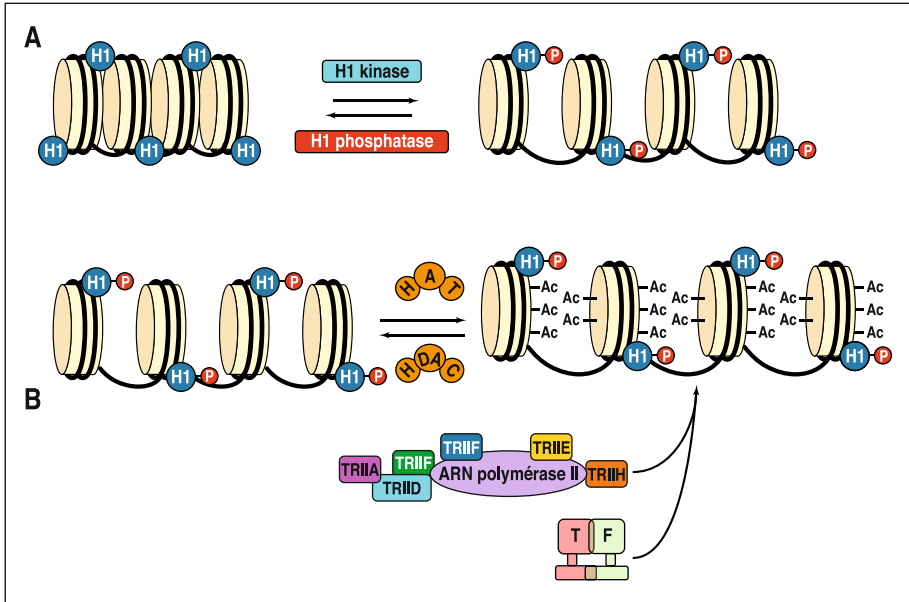


Fig. B-9 – Modulation de la transcription en fonction de la chromatine.

A. La chromatine « inactive » a une structure compacte : les nucléosomes ne permettent pas l'accès de la machinerie de la transcription. La phosphorylation de l'histone H1 permet la relaxation de la chromatine et l'activité transcriptionnelle. Elle est réalisée par des kinases spécialisées et la déphosphorylation est réalisée par des phosphatases.

B. L'acétylation des histones 2A, 2B, 3 et 4 permet également d'activer la transcription grâce à la décondensation de la chromatine et l'accessibilité des séquences à transcrire par la machinerie de la transcription et par les facteurs protéiques de contrôle de la transcription. Cette acétylation est réalisée par des histones acétyltransférases (HAT) et la désacétylation par des histones désacétylases (HDAC).

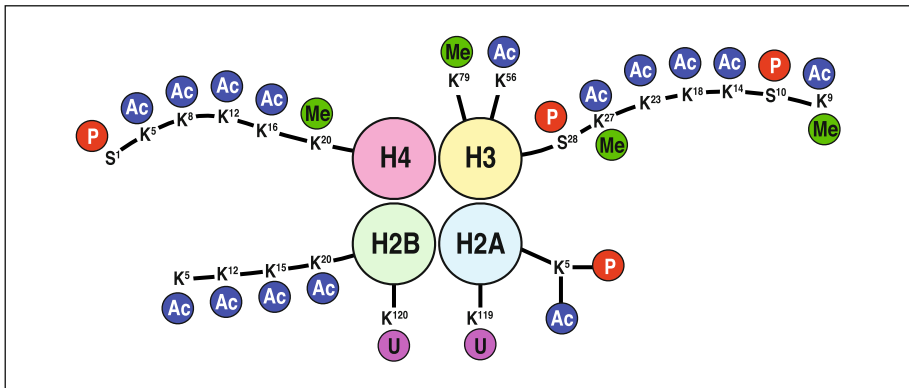


Fig. B-10 – Modifications post-traductionnelles des histones.

Les histones peuvent subir de nombreuses modifications post-traductionnelles de leurs parties N-terminales au niveau de résidus lysine (méthylations, acétylations), de sérines (phosphorylations). Elles peuvent également subir une ubiquitinylation sur certains résidus (voir Annexe C).

acétyltransférases et désacétylases, kinases et phosphatases) au niveau de gènes spécifiques et définissent ainsi le marquage des histones dans l'environnement des gènes. Ce code des histones est complexe, en raison du nombre de sites possibles sur chaque histone et de la combinaison des modifications susceptibles d'y être apportées. Il est reproduit dans les tissus, pour chaque gène semble-t-il, d'une cellule mère à une cellule fille et représente, avec la méthylation de l'ADN, un deuxième type de transmission de l'information que l'on appelle épigénétique.

Le profil de marquage des histones est représenté par un ensemble de sigles où figure le nom de l'histone, l'acide aminé modifié et sa position dans la chaîne polypeptidique, et la modification subie. Par exemple, HB2K120ac signifie « Histone B2, lysine 120, acétylation ». Ces profils ont été établis dans quelques types cellulaires pour des ensembles de plusieurs milliers de gènes et associés à un niveau d'expression élevé, moyen ou faible. Par exemple, les marques associées avec une transcription active sont la triméthylation de la lysine en 79 de l'histone H3 (H3K79me₃), la méthylation de la lysine en 20 de l'histone H4 (H4K20me₁, H4K20me₂, H4K20me₃) et l'acétylation des lysines 4, 9, 18, 27 et 36 de l'histone H3 (H3K4ac, H3K9ac, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac) et des lysines 5, 8 et 91 de l'histone H4 (H4K5ac, H4K8ac, H4K91ac). À l'opposé, les marques de triméthylation des lysines 4, 9 et 27 de l'histone H3 (H3K4me₃, H3K9me₃, H3K27me₃) et de la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me₃) correspondent à une répression de l'expression des gènes qui les portent. De façon générale, il a été suggéré qu'un niveau globalement élevé d'acétylation des histones est associé au maintien des cellules dans un état indifférencié et pluripotent, alors qu'un niveau de méthylation élevé accompagne la différenciation cellulaire et la perte de l'expression des gènes correspondants.

Une classe de protéines appelées les protéines Polycomb sont impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones. Ces protéines forment des complexes qui se fixent sur des sites spécifiques des promoteurs de leurs gènes cibles (PRE, pour *Polycomb response elements*), où ils sont recrutés par des facteurs de transcription ou par des molécules d'ARN non codants assez longues (200 nucléotides) appelées ncRNA. Les protéines Polycomb entraînent la répression permanente de l'expression de leurs gènes cibles, des gènes qui sont souvent impliqués dans le développement et la différenciation des tissus, comme les régulateurs négatifs du cycle cellulaire (chapitre 17) que sont les protéines de la famille INK4 et de la famille CIP/KIP (CDKN2B ou p15^{INK4b} et CDKN2A ou p16^{INK4a}/p14^{ARF}). Nous avons vu que les promoteurs de ces gènes étaient fréquemment hyperméthylés ; il est vraisemblable que la répression de l'expression génique par méthylation et par les protéines Polycomb sont deux phénomènes associés.

Il existe des altérations importantes des différentes substitutions rencontrées dans les histones des cellules cancéreuses. Par exemple, le promoteur du gène *CDKN2A* (p16^{INK4a}) présente une hyperméthylation H3K9 et une hypométhylation H3K4 dans les cancers colorectaux. Il est évidemment impossible de répertorier les altérations spécifiques rencontrées pour en tirer des informations générales, mais quelques tendances existent. C'est ainsi qu'une réduction de H4K16ac et de H4K20me₃ est générale au cours du développement de nombreuses tumeurs, en particulier dans les

séquences répétitives, en association avec une hypométhylation des îlots CpG de l'ADN (paragraphe précédent). Des liens entre de telles modifications des histones et l'évolution et le pronostic des cancers sont activement recherchés. L'origine de telles modifications des histones peut être recherchée au niveau des protéines Polycomb, qui sont fréquemment surexprimées dans les cancers, à la suite d'amplifications ou de translocations de leurs gènes. C'est le cas, par exemple, d'EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), qui est une lysine N-méthyltransférase, dans de nombreuses tumeurs.

L'acétylation des histones par les histone désacétylases (HDAC) peut constituer une cible pharmacologique intéressante et plusieurs inhibiteurs naturels et synthétiques ont été développés, le premier d'entre eux étant l'acide valproïque, suivi de dérivés de l'acide hydroxamique et de peptides cycliques. De nombreux inhibiteurs des HDAC, appelés HDI, sont en phase d'études cliniques et ont une indication dans le traitement des lymphomes T cutanés. Ils induisent l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose dans plusieurs types de cellules cancéreuses. Ils pourraient agir en levant l'inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, comme CDKN2A (p16^{INK4a}), CDKN1A (p21^{CIP1}) ou RB1. Toutefois, ils exercent des actions pléiotropes au niveau cellulaire et il n'est pas certain que l'inhibition de la désacétylation des histones soit leur mécanisme d'action unique, ni même principal. On pense qu'ils pourraient potentialiser l'action de la chimiothérapie cytotoxique par les agents alkylants ou platinants en facilitant l'accessibilité de l'ADN grâce à la décompaction de la chromatine.

Les micro-ARN

Les micro-ARN (MIR) sont de petits ARN de dix-neuf à vingt-quatre nucléotides, non codants, impliqués dans la régulation de l'expression d'environ 30 % des gènes du génome humain. Leur nombre total devrait avoisiner le millier d'espèces moléculaires. Les gènes des MIR sont localisés pour 70 % d'entre eux dans les introns (parfois les exons) de gènes codants, et pour 30 % dans des régions intergéniques. Ils sont d'abord transcrits par l'ARN polymérase II en séquences longues de plusieurs kb, munies comme tous les ARNm d'une coiffe de MeGTP et d'une queue poly(A). Ces précurseurs primaires (pri-MIR) sont ensuite maturés grâce à une coupure réalisée par une RNase nucléaire nommée Drosha (RNASEN), pour donner naissance aux pré-MIR de 65 à 85 nucléotides. Les pré-MIR ont une structure en épingle à cheveux comportant une tige à double brin surmontée d'une boucle. Ils sont ensuite exportés vers le cytoplasme par une protéine appelée exportine 5 (XPO5). Les pré-MIR se lient alors avec une autre RNase appelée DICER (*Double-stranded RNA-specific endoribonuclease*) dans un complexe appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*), composé également d'une protéine TRBP (*Transactivation-responsive RNA-binding protein*) et d'une protéine AGO2 (*Argonaute 2*). Les MIR sont générés par DICER sous forme double brin ; le brin actif reste attaché au RISC, le brin antisens est dégradé (fig. B-11).

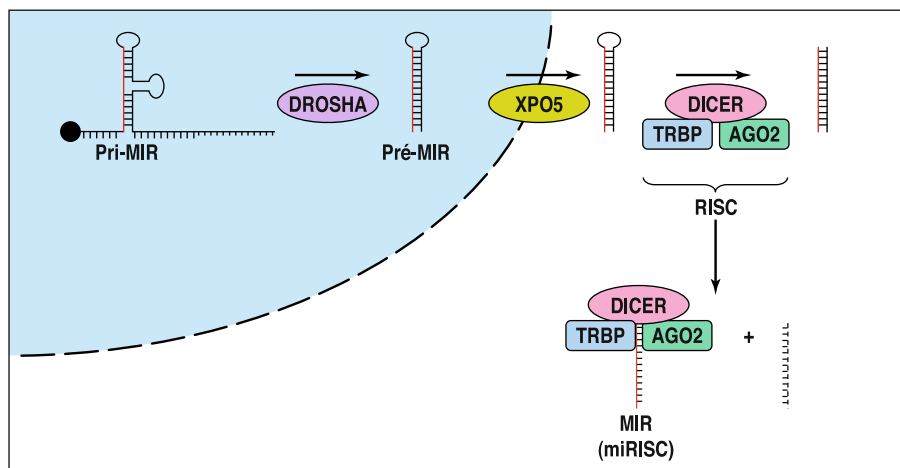


Fig. B-11 – Génération des micro-ARN (MIR).

La transcription de séquences spécifiques de l'ADN donne naissance à des messagers particuliers, les pri-MIR, avec coiffe et queue poly(A). La maturation des pri-MIR commence dans le noyau où ils sont convertis en structure double brin avec une boucle, le pré-MIR, grâce à la nucléase DROSHA. Ils sont alors exportés dans le cytoplasme par le transporteur XPO5, puis pris en charge par la nucléase DICER, dans le complexe RISC, qui élimine le brin anti-sens *via* la nucléase AGO2 et reste attachée au MIR.

Les MIR matures de dix-neuf à vingt-cinq nucléotides reconnaissent, au niveau de leurs deux à huit premiers nucléotides en 5', région appelée la « graine » (*seed region*), des séquences (imparfaitement) complémentaires d'ARNm cibles au niveau de leur extrémité 3' non traduite (3'UTR). Elles fixent le complexe RISC qui pourra, soit dégrader l'ARNm, soit inhiber sa traduction en protéine (fig. B-12). Une inhibition de la traduction par d'autres mécanismes est en outre exercée par les MIR, et leur mécanisme d'action reste débattu. Du fait que la séquence du MIR n'est que partiellement complémentaire de la séquence reconnue au niveau 3'UTR des ARNm, le même MIR peut inhiber la traduction de plusieurs dizaines de messagers différents, et des algorithmes permettent de prévoir quels messagers sont susceptibles de reconnaître un MIR de séquence déterminée. Les fonctions exercées par les MIR sont par conséquent multiples, et toutes les activités cellulaires peuvent être régulées par des MIR. Comme on a établi des profils d'expression des ARNm présents dans un tissu à un instant donné, des profils d'expression des MIR ont été établis dans de nombreux types cellulaires ; des altérations quantitatives ou qualitatives des MIR sont susceptibles d'altérer leur fonction régulatrice.

L'implication des MIR dans l'oncogenèse a été reconnue très rapidement après leur découverte. Les MIR peuvent fonctionner de façon analogue aux produits des oncogènes et des gènes suppresseurs, selon leur cible. C'est ainsi que les MIR de la famille LET7 se comportent comme des suppresseurs de tumeurs : ils sont capables de réprimer l'expression des gènes RAS (chapitre 2) de façon post-transcriptionnelle et peuvent induire l'arrêt du cycle et la mort cellulaire. À l'inverse, le MIR 214, qui

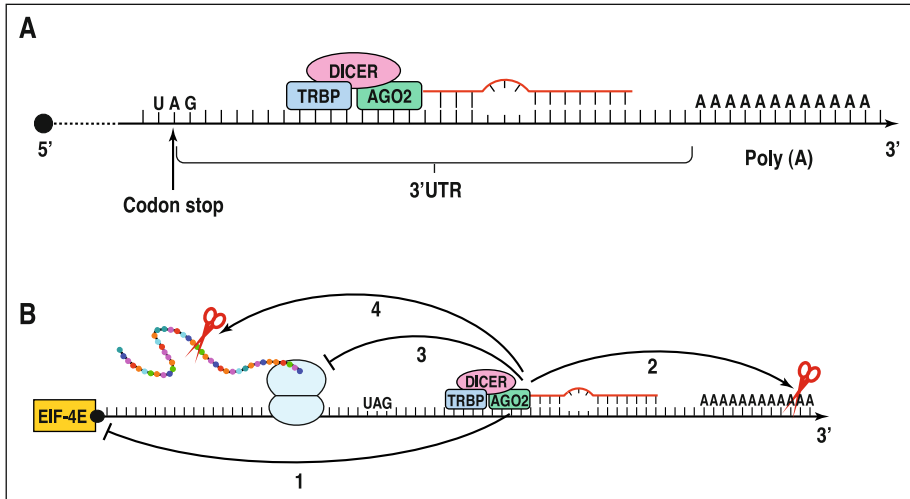


Fig. B-12 – Mécanisme d'action des micro-ARN (MIR).

A. Les MIR reconnaissent de façon imparfaite des séquences d'ARN messagers, généralement dans les régions 3'UTR, entre le codon stop et la queue poly(A).

B. Le complexe RISC est capable (1) d'inhiber l'étape d'initiation de la traduction du messager ; (2) de détruire la queue poly(A) du messager ; (3) d'inhiber l'étape d'élongation de la synthèse protéique ; (4) de détruire la protéine en cours de formation.

réprime l'expression de PTEN (chapitre 3), se comporte comme un produit d'oncogène. De façon générale, les MIR interviennent dans la régulation de la plupart des voies de signalisation de la prolifération et de la mort cellulaire, comme la figure B-6 en donne un aperçu. Les gènes des MIR subissent, comme les oncogènes et les gènes suppresseurs, des altérations quantitatives (variations d'expression) et qualitatives (mutations, polymorphismes) qui expliquent leurs rôles dans l'oncogenèse. Par exemple, le facteur de transcription MYC active un *cluster* de gènes de MIR impliqués dans la régulation de l'expression de facteurs de transcription de la famille E2F. Nous renvoyons la description complète des fonctions des MIR aux ouvrages dédiés aux mécanismes de l'oncogenèse.

L'établissement de profils d'expression des MIR et l'identification de polymorphismes pourront aboutir à leur utilisation dans le diagnostic, le pronostic et la prédiction de réponse des cancers au traitement. Sur le plan thérapeutique, les MIR peuvent faire l'objet d'un ciblage par des oligonucléotides antisens baptisés antigomirs, et une recherche active vise à trouver les moyens d'utiliser ces derniers *in vivo*. De façon plus générale, la découverte des MIR a permis la mise au point d'une stratégie générale d'inhibition spécifique de l'expression des gènes, en utilisant de courtes molécules d'ARN susceptibles d'interférer avec les messagers, d'où leur nom de petits ARN interférents (siRNA, pour *Small interfering RNA*). Ces derniers reconnaissent des séquences spécifiques des ARN messagers et induisent l'activité du RISC pour les

hydrolyser. Cette technologie est maintenant très utilisée expérimentalement en biologie moléculaire pour inhiber spécifiquement l'expression des gènes. Les applications thérapeutiques en oncologie seront nombreuses dès que l'on saura les utiliser comme médicaments, c'est-à-dire que l'on pourra assurer leur biodisponibilité jusque dans le cytoplasme des cellules cibles.

L'épissage alternatif

Nous avons vu plus haut que l'épissage est une nécessité pour la maturation des messagers eucaryotes, en raison de la structure discontinue des gènes où introns et exons se succèdent. Une des caractéristiques de l'épissage est qu'il existe des variations dans le choix des exons maintenus lors de l'élimination des introns. Ces variations concernent environ 90 % des gènes et sont la règle générale et non l'exception ; elles permettent la synthèse d'un nombre de protéines différentes bien supérieur à celui des gènes : l'ancien dogme « un gène, une protéine » a été pris en défaut lorsque a été découvert l'épissage alternatif. Nous ne décrirons pas ici les mécanismes qui président au choix entre « exon constitutif » et « exon alternatif » lors de l'épissage. Ils mettent en jeu des protéines nucléaires diverses, en particulier des protéines à domaines riches en dipeptides sérine-arginine (domaines SR) et des hnRNP (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) qui se lient à des domaines activateurs ou répresseurs des exons ou des introns transcrits dans l'ARN messager primaire. L'activation de telles protéines est l'aboutissement de voies de signalisation diverses ; l'épissage alternatif est donc dirigé par des signaux d'origine extra- ou intracellulaire.

Plusieurs modalités élémentaires d'épissage alternatif existent (fig. B-13) : (i) un exon alternatif donné (exon « cassette ») est conservé ou non ; (ii) l'un ou l'autre de deux exons mutuellement exclusifs est conservé ; (iii) il y a compétition entre deux sites donneurs GU pour l'épissage ; (iv) il y a compétition entre deux sites receveurs AG pour l'épissage ; (v) il y a conservation d'une structure normalement intronique dans l'ARN messager mature. S'ajoutent deux types d'événements aboutissant au même résultat que l'épissage alternatif, c'est-à-dire à l'existence de transcrits distincts du même gène, aboutissant à des protéines distinctes : l'existence de promoteurs alternatifs qui modifient la séquence N-terminale de la protéine ; et l'existence de sites de polyadénylation alternatifs, qui modifient la séquence C-terminale de la protéine.

Il existe de multiples altérations de l'épissage alternatif dans les cancers ; certaines d'entre elles sont réellement oncogéniques, d'autres concourent à l'oncogenèse sans nécessairement y jouer un rôle décisif. Des approches à haut débit ont été développées pour cataloguer l'ensemble des altérations d'épissage des cellules cancéreuses, afin de fournir des profils d'épissage s'ajoutant aux divers profils des altérations moléculaires des cancers évoquées dans les paragraphes précédents. Ces altérations peuvent avoir plusieurs origines :

- elles peuvent porter sur les protéines responsables de l'exécution ou du contrôle de l'épissage, comme les protéines SR. La surexpression de l'une d'elles, SFRS1 (*Splicing factor, arginine/serine-rich 1*), impliquée dans l'épissage de protéines de signalisation des voies des MAP kinases (chapitre 2) et de la PI3 kinase

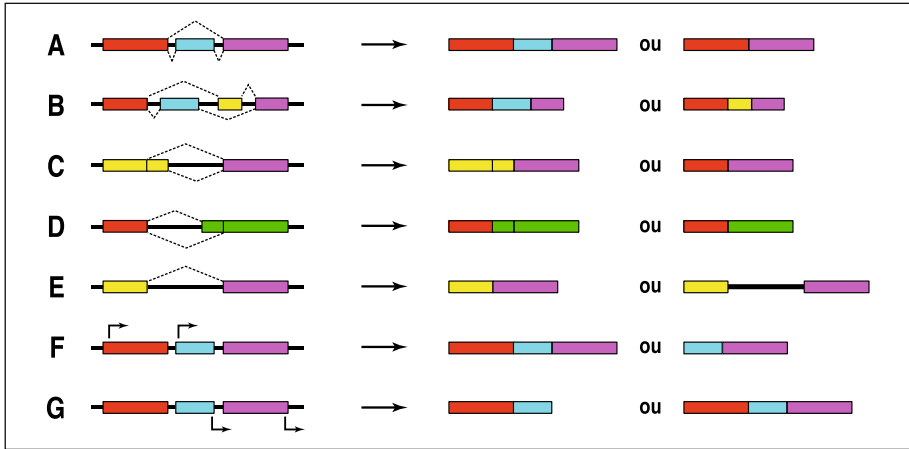


Fig. B-13 – Modalités de l'épissage alternatif.

L'épissage alternatif peut permettre d'exclure un exon (A), de remplacer un exon par un autre (B), d'utiliser un site donneur GU ou un autre (C), d'utiliser un site receveur AG ou un autre (D), de conserver une structure intronique habituellement épissée (E), d'utiliser un promoteur ou un autre (F), d'utiliser un site de polyadénylation ou un autre (G).

(chapitre 3), est associée à l'oncogénèse et peut être considérée comme une véritable oncoprotéine;

- par ailleurs, on rencontre dans les cancers des mutations au niveau des sites d'épissage, qui conduisent à un épissage alternatif pathologique, intégrant ou éliminant des séquences qui ne devraient pas l'être. De telles mutations ont été décrites au niveau du gène APC (*Adenomatous polyposis coli*) (chapitre 7) ou au niveau d'un gène de réparation de l'ADN, BRCA1 (*Breast cancer 1*). Il s'agit donc de mutations oncogéniques d'une variété particulière qui est loin d'être exceptionnelle.
- enfin, il faut prendre en compte le fait que l'épissage alternatif est un des mécanismes fondamentaux pour que la protéine synthétisée soit adaptée à sa fonction à chaque étape du développement de l'individu. La réactivation de la synthèse de certaines isoformes de structure normale peut ainsi concourir à l'oncogénèse. On peut citer l'exemple de la protéine RAC1, une petite protéine G que l'on rencontre dans les cancers du côlon sous une forme variante, RAC1b, comprenant 19 acides aminés supplémentaires résultant de la présence d'un exon qui n'est pas épissé comme dans la protéine tissulaire normale RAC1a.

L'épissage alternatif peut servir de cible potentielle au traitement des cancers. On peut chercher à intervenir sur les protéines responsables de la régulation de l'épissage, à l'aide de petites molécules sélectionnées dans le cadre d'approches à haut débit. On peut également tenter de cibler les sites d'épissage ou les sites de régulation de l'épissage sur l'ARN messager primaire à l'aide d'approches antisens. Ces approches butent toujours sur le problème de la pénétration des oligonucléotides dans les cellules où ils doivent exercer leur action. La protéine BCLX (ou BCL2L1) est une protéine de la

famille BCL2 (chapitre 18) qui est anti-apoptotique dans sa version longue (BCLXL), obtenue par utilisation d'un site d'épissage, et pro-apoptotique dans sa version courte (BCLXS), obtenue par utilisation d'un autre site d'épissage, en amont de l'autre. Le blocage du site d'épissage d'aval pourrait contribuer à la mort cellulaire dans les tumeurs où BCLXL est surexprimée. Dans un autre exemple, celui de l'épissage alternatif du messenger du FGFR1 (*Fibroblastic growth factor receptor 1*, chapitre 1), c'est le blocage d'une séquence répresseur de l'épissage qui a été proposé.

Bibliographie

Machinerie de la transcription

Etienne J, Clauser E, Housset C, Roingeard P. (2006) Biochimie génétique, biologie moléculaire. Masson, Paris; 294 p.

Weil JH. (2001) Biochimie générale, 9^e édition. Dunod, Paris; 655 p.

Contrôle de la transcription

Darnell JE. (2002) Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 2: 740-9.

Farnham PJ. (2009) Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet*; 10: 605-16.

Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. (2009) A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*; 10: 252-63.

Méthylation de l'ADN

Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4632-42.

Issa JP. (2007) DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*; 13: 1634-7.

Goodman JL, Watson RE. (2002) Altered DNA methylation: a secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 42: 501-25.

Robertson KD. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genetics*; 6: 597-610.

Szyf M. (2006) Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer*; 93: 961-72.

Histones

Batty N, Malouf GG, Issa JP. (2009) Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett*; 280: 192-200.

Bracken AP, Helin K. (2009) Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer*; 9: 773-84.

Esteller M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*; 8: 286-98.

Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. (2008) Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med*; 59: 267-80.

Lennartsson A, Ekwall K. (2009) Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta*; 1790: 863-8.

Lopez J, Percharde M, Coley HM *et al.* (2009) The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*; 100: 571-7.

Minucci S, Pelicci PG. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*; 6: 38-51.

- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*; 31: 27-36.
- Yoo CB, Jones PA. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*; 5: 37-50.

Micro-ARN

- Calin GA, Croce CM. (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*; 6: 857-66.
- Gartel AL, Kandel ES. (2008) miRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol*; 18: 103-10.
- Garzon R, Calin GA, Croce CM. (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med*; 60: 167-79.
- Medina PP, Slack FJ. (2008) MicroRNAs and cancer: an overview. *Cell Cycle*; 7: 2485-92.
- Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M *et al.* (2009) MicroRNAs – the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*; 9: 293-302.
- Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME. (2008) MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene*; 27: 5959-74.

Épissage alternatif

- Matlin AJ, Clark F, Smith CW. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 386-98.
- Shin C, Manley JL. (2004) Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 5: 727-38.
- Skotheim RI, Nees M. (2007) Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int J Biochem Cell Biol*; 39: 1432-49.
- Venables JP. (2004) Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res*; 64: 7647-54.

Annexe C

Le contrôle de l'activité des protéines

Introduction

Cette troisième annexe complète les précédentes ; elle reprend les ARN messagers matures au niveau des sites cytoplasmiques où ils vont être traduits en protéines, et décrit ensuite les modifications que vont subir les protéines pour mettre en œuvre leurs activités, et ce jusqu'à leur destruction programmée. Ce sont les protéines qui exécutent la totalité des ordres et des programmes contenus dans le matériel génétique ; de multiples processus de régulation de leur activité doivent intervenir pour que l'exécution de ces ordres puisse intégrer les signaux qu'elles reçoivent de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule. Si un total d'environ 25 000 gènes suffit à la programmation de la vie d'un mammifère, on a calculé que l'ensemble des formes protéiques qui peuvent exister à l'intérieur d'une cellule pouvait avoisiner le million : par le biais de l'épissage alternatif, d'abord, qui a été décrit dans l'Annexe B ; par le jeu des phosphorylations, glycosylations, prénylations, et autres modifications covalentes ensuite ; par la distribution subcellulaire enfin de ces protéines qui conditionne souvent leur activité : selon qu'il se trouve dans la mitochondrie ou dans le cytoplasme, le cytochrome c, pour ne prendre qu'un exemple, a des fonctions totalement différentes, ressortissant à deux cadres fonctionnels indépendants.

Nous avons vu au cours des chapitres de cet ouvrage combien les phénomènes de régulation de l'activité des protéines sont importants pour la transduction des informations : cette annexe a pour objectif de décrire les règles générales qui président à la mise en œuvre du contrôle de l'activité des protéines, en suivant ces dernières de leur naissance à leur mort. Nous renvoyons le lecteur aux excellents manuels de biologie moléculaire pour approfondir les notions de base. Ces processus sont souvent altérés dans les cancers : il suffit de se souvenir que la plupart des enzymes assurant les opérations de phosphorylation, les kinases, sont des produits d'oncogène.

La machinerie de la traduction

L'existence de quatre nucléotides différents, dans l'ARNm comme dans l'ADN, devant correspondre à vingt acides aminés nécessaires à la structure des protéines, requiert l'existence d'un code d'au moins trois nucléotides par acide aminé. Un code à deux nucléotides ne permettrait que seize combinaisons, un code à trois nucléotides permet soixante-quatre combinaisons. Ce sont effectivement des codons de trois nucléotides qui sont utilisés pour faire correspondre la séquence de l'ADN à celle des protéines. Il s'ensuit que le code génétique est dégénéré : plusieurs codons de trois nucléotides peuvent correspondre au même acide aminé. Lorsqu'un acide aminé correspond à plusieurs codons, les deux premiers nucléotides sont généralement conservés, et le remplacement du troisième par mutation n'aura pas de conséquence sur la séquence protéique. Trois codons ne servent pas à spécifier un acide aminé, mais sont utilisés pour terminer la synthèse de la protéine (codons stop). Il existe en théorie trois cadres de lecture possibles ; un seul est utilisé en fait : il est repéré par le codon d'initiation de la traduction, le codon AUG. La traduction utilise de petits ARN, appelés ARN de transfert (ARNt), qui apportent d'une part l'acide aminé nécessaire à la synthèse de la chaîne protéique, et d'autre part l'information génétique, apportée par un triplet de nucléotides appelé anticodon, lui permettant de reconnaître sur l'ARNm le codon adéquat. La figure C-1 présente la structure générale d'un ARN de transfert et le tableau C-1 le code génétique.

La traduction se déroule sur de volumineux complexes macromoléculaires appelés ribosomes, associant des ARN, les ARN ribosomiaux (ARNr), et des protéines, les protéines ribosomiales. Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités, la grande (L) et la petite (S). Ils contiennent plusieurs sites de liaison pour d'autres ARN : un site pour l'ARNm et trois pour les ARNt. Les ARNt, apportant un nouvel acide aminé, se lient au site A ; l'acide aminé est couplé à la chaîne peptidique en cours d'élongation sur un site appelé P et l'ARNt dépouillé de son acide aminé est évacué par l'intermédiaire du site E (fig. C-2). La traduction débute par la fixation, sur la petite sous-unité d'un ribosome, d'un ARNt particulier appelé ARNt initiateur, porteur de l'anticodon d'initiation CAU (lu de 5' vers 3'), et d'une méthionine. Se fixent également sur le ribosome des facteurs protéiques d'initiation EIF (*Eukaryotic initiation factor*), EIF2, fait de trois sous-unités α , β et γ , puis EIF4E et EIF4G, dont la fonction est régulée par phosphorylation (voir chapitre 3). La petite sous-unité ribosomale se lie alors à l'extrémité 5' d'un ARNm, reconnu grâce à sa coiffe de 7-méthylguanosine 5'-diphosphate (Annexe B) et avance le long de l'ARNm jusqu'au premier codon AUG reconnu par l'anticodon de l'ARNt initiateur. La région de l'ARNm en amont du codon AUG n'est pas traduite et porte le nom de région 5'UTR (*Untranslated region*). Les facteurs EIF se dissocient de la petite sous-unité ribosomale, remplacés par la grande sous-unité ribosomale pour former le ribosome complet.

Un cycle de trois étapes est alors entrepris pour permettre, à partir de la méthionine initiale, de synthétiser la chaîne polypeptidique. Un ARNt, porteur de l'anticodon reconnaissant le codon qui suit le codon initiateur AUG et de l'acide aminé correspondant, se lie sur le site A du ribosome ; une liaison peptidique est formée

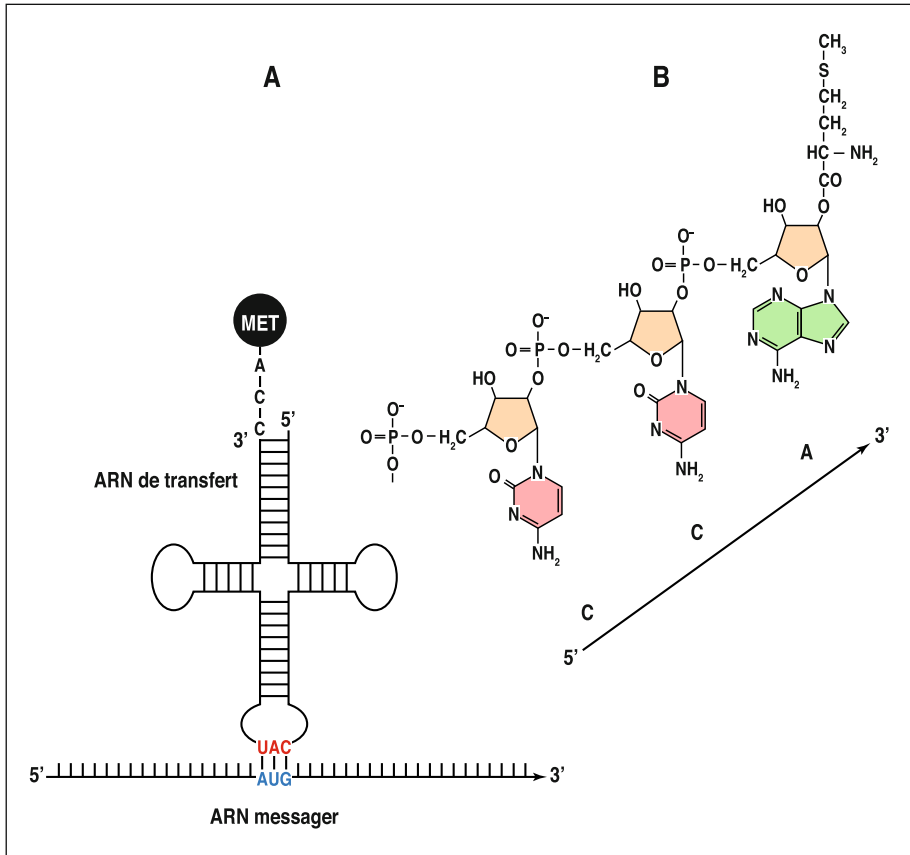


Fig. C-1 – Structure des ARN de transfert.

A. Les ARN de transfert présentent une structure repliée en feuille de trèfle, grâce aux appariements entre nucléotides qui lui confèrent cette structure secondaire. Les trois nucléotides (en rouge) représentent l'anticodon qui reconnaît le codon correspondant (en bleu) au niveau de l'ARN messager. Du côté 3' terminal, les trois derniers nucléotides sont toujours deux acides cytidyliques C et un acide adénylique A lié à l'acide aminé par une liaison ester. L'exemple choisi est celui de l'ARN de transfert de la méthionine (tRNA^{met}), caractérisé par l'anticodon CAU qui reconnaît le codon initiateur AUG.

B. La séquence 3' terminale CCA et sa liaison avec la méthionine.

Tableau C-1 – Le code génétique.

1 ^{er} \ 2 ^e	U	C	A	G	3 ^e
U	UUU phe	UCU ser	UAU tyr	UGU cys	U
	UUC phe	UCC ser	UAC tyr	UGC cys	C
	UUA leu	UCA ser	UAA stop	UGA stop	A
	UUG leu	UCG ser	UAG stop	UGG trp	G
C	CUU leu	CCU pro	CAU his	CGU arg	U
	CUC leu	CCC pro	CAC his	CGC arg	C
	CUA leu	CCA pro	CAA gln	CGA arg	A
	CUG leu	CCG pro	CAG gln	CGG arg	G
A	AUU ile	ACU thr	AAU asn	AGU ser	U
	AUC ile	ACC thr	AAC asn	AGC ser	C
	AUA ile	ACA thr	AAA lys	AGA arg	A
	AUG met	ACG thr	AAG lys	AGG arg	G
G	GUU val	GCU ala	GAU asp	GGU gly	U
	GUC val	GCC ala	GAC asp	GGC gly	C
	GUA val	GCA ala	GAA glu	GGA gly	A
	GUG val	GCG ala	GAG glu	GGG gly	G

Deux codes servent à désigner les acides aminés constitutifs des protéines : le code à trois lettres utilisé dans ce tableau et le code à une lettre. La correspondance est la suivante :

Alanine	ala	A	Leucine	leu	L
Acide aspartique	asp	D	Lysine	lys	K
Acide glutamique	glu	E	Méthionine	met	M
Arginine	arg	R	Phénylalanine	phe	F
Asparagine	asn	N	Proline	pro	P
Cystéine	cys	C	Sérine	ser	S
Glutamine	gln	Q	Thréonine	thr	T
Glycine	gly	G	Tryptophane	trp	W
Histidine	his	H	Tyrosine	tyr	Y
Isoleucine	ile	I	Valine	val	V

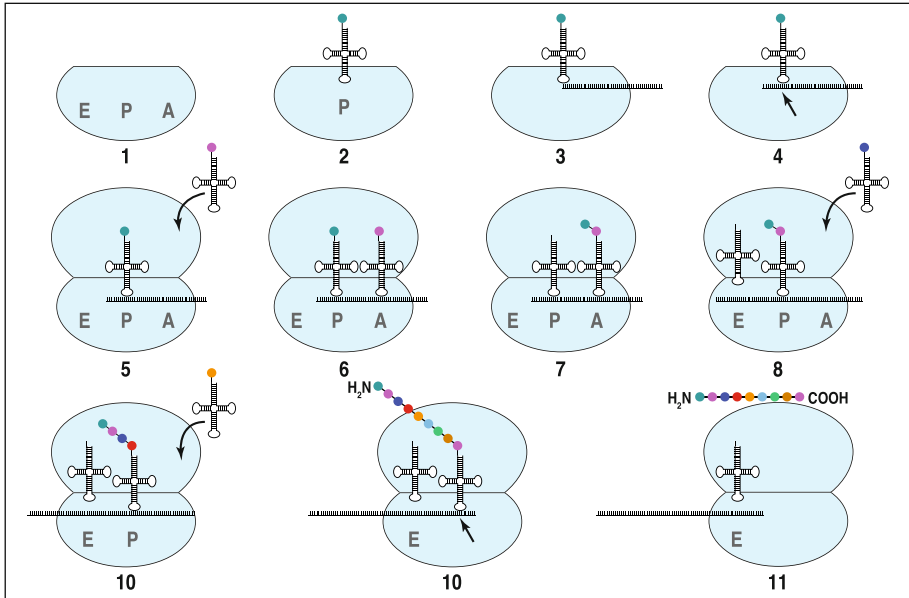


Fig. C-2 – Les étapes de la traduction de l'ARN messenger en protéines.

Initiation : La petite sous-unité du ribosome (1) fixe un ARN de transfert initiateur sur le site P (2) ainsi que des facteurs protéiques EIF (non représentés ici). La petite sous-unité ribosomale se lie alors à l'extrémité 5' d'un ARNm (3), reconnu grâce à sa coiffe, et avance le long de l'ARNm jusqu'au premier codon AUG reconnu par l'anticodon de l'ARNt initiateur, marqué d'une flèche (4). La grande sous-unité ribosomale se fixe alors (5) pour former le ribosome complet.

Élongation : Un ARNt, porteur de l'anticodon reconnaissant le codon qui suit le codon initiateur AUG et de l'acide aminé correspondant, se lie sur le site A du ribosome (6). Une liaison peptidique est formée entre le COOH de l'acide aminé en amont et le NH₂ de l'acide aminé en aval (7). La liaison entre l'acide aminé d'amont et son ARNt est rompue et l'ARNt correspondant migre sur le site E du ribosome, pendant que l'ARNt du nouvel acide aminé, maintenant porteur d'une chaîne peptidique en cours d'élongation, migre sur le site P (8). Le ribosome avance alors d'un « cran », c'est-à-dire de trois nucléotides, le long de l'ARNm, l'ARNt du site E est évacué, un nouvel ARNt, porteur d'un nouvel anticodon et d'un nouvel acide aminé, peut alors se fixer sur le site A et le cycle recommence (9). Ce cycle se reproduit autant de fois que la chaîne peptidique comporte d'acides aminés. Des facteurs protéiques d'élongation EEF (non représentés ici) sont nécessaires à ces opérations.

Terminaison : La fin du processus est assurée par la rencontre d'un codon stop marqué d'une flèche (UAA, UAG, UGA), non reconnu par un ARNt, donnant par là un signal de terminaison de la traduction (10). Des facteurs protéiques de terminaison reconnaissent le site A vacant ; la chaîne polypeptidique est détachée de l'ARN de transfert et du ribosome (11). L'ARNm est détaché à son tour du ribosome, dont les deux sous-unités se dissocient pour être ensuite réutilisées pour la synthèse d'une nouvelle protéine.

entre le COOH de l'acide aminé en amont (le premier étant la méthionine) et le NH₂ de l'acide aminé en aval. Cette liaison est catalysée par l'activité peptidyltransférase de la grande sous-unité ribosomale. La liaison entre l'acide aminé d'amont et son ARNt est rompue et l'ARNt correspondant migre sur le site E du ribosome pendant que l'ARNt du nouvel acide aminé, maintenant porteur d'une chaîne peptidique en cours d'élongation, migre sur le site P. Le ribosome avance alors d'un « cran », c'est-à-dire de trois nucléotides, le long de l'ARNm, l'ARNt du site E est évacué, un nouvel ARNt, porteur d'un nouvel anticodon et d'un nouvel acide aminé, peut alors se fixer sur le site A et le cycle recommence. Des facteurs protéiques d'élongation EEF (*Eukaryotic elongation factor*) veillent à la fidélité du processus de traduction ou participent au mouvement de l'ARNt du site A au site P et du site P au site E. La figure C-2 présente le cycle d'allongement des chaînes protéiques.

La fin du processus de traduction est assurée par la rencontre d'un codon stop (UAA, UAG, UGA), non reconnu par un ARNt, donnant par là un signal de terminaison de la traduction. Des facteurs protéiques de terminaison reconnaissent le site A vacant ; la peptidyltransférase ne peut transférer aucun acide aminé sur l'extrémité COOH libre de la chaîne polypeptidique et celle-ci est détachée de l'ARN de transfert et du ribosome. L'ARNm est détaché à son tour du ribosome, dont les deux sous-unités se dissocient pour être ensuite réutilisées pour la synthèse d'une nouvelle protéine. En fait, un même ARNm est « lu » simultanément par plusieurs complexes ribosomiaux qui « avancent » régulièrement le long de la séquence nucléotidique, donnant à la particule un aspect caractéristique appelé polysome.

De nombreux mécanismes de contrôle de la traduction viennent s'ajouter aux mécanismes de contrôle de la transcription (Annexe B) pour adapter la synthèse des protéines aux besoins de la cellule. C'est ainsi que des répresseurs traductionnels se liant à l'extrémité 5' de l'ARNm peuvent empêcher la lecture des messagers jusqu'à ce que la présence d'un ligand vienne les en détacher, quand se présente pour la cellule la nécessité de les traduire. Une autre régulation est exercée par la phosphorylation des facteurs d'initiation EIF et des facteurs d'élongation EEF ; ces derniers sont des petites protéines G que la phosphorylation est susceptible d'inhiber. Enfin, un cas particulier se rencontre au niveau de certains messagers qui possèdent des séquences, le plus souvent dans la région 5'UTR, capables de prendre une structure secondaire leur permettant d'être reconnus par des facteurs d'initiation de la traduction (EIF4G) : ce sont les séquences IRES (*Internal ribosome entry site*) (fig. C-3).

Les séquences IRES servent de point de départ à la traduction d'une protéine distincte de celle initiée à partir du premier codon AUG rencontré sur l'ARNm, appelée « traduction dépendante de la coiffe ». La majeure partie des IRES identifiés à ce jour ont été trouvés dans les ARNm codant pour des protéines associées au contrôle de la prolifération et de la mort cellulaire. Une traduction dépendante d'IRES est rencontrée pour la traduction des ARNm des gènes codant pour des facteurs de transcription (chapitre 2 : MYC, JUN ; chapitre 5 : SMAD5 ; chapitre 17 : p53 ; chapitre 16 : HIF1 α), des régulateurs de l'apoptose (chapitre 18 : XIAP, APC, APAF1), des facteurs de croissance (chapitre 1 : FGF2, PDGF1, VEGFA, IGF2), des récepteurs divers (chapitre 14 : ER α ; chapitre 1 : IGF1R ; chapitre 8 : NOTCH2), etc.

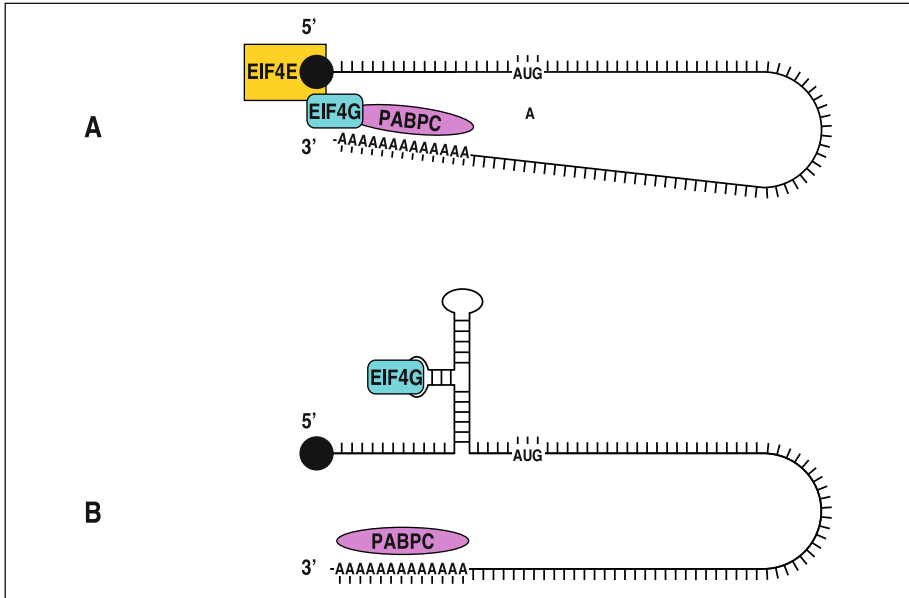


Fig. C-3 – Traduction dépendante de la coiffe et traduction dépendante d'un IRES.

A. La traduction dépendante de la coiffe nécessite l'intervention des facteurs d'initiation EIF4E dont la disponibilité dépend de la mise en jeu de régulations complexes impliquant en particulier la protéine MTOR (voir chapitre 3).

B. La traduction dépendante des IRES peut être mise en jeu plus rapidement ; les IRES sont des structures secondaires de certains ARN messagers, qui sont capables d'activer la traduction après simple reconnaissance d'un facteur d'initiation EIF4G.

Cette modalité d'initiation de la traduction peut représenter un « raccourci » permettant une synthèse rapide de protéines nécessaires à la mitose ou à la mort cellulaire, lorsque les facteurs d'initiation de la traduction dépendant de la coiffe, comme EIF4E, sont inhibés. Cette voie est utilisée par certains virus pour que leur ARNm soit traduit prioritairement sur les protéines de la cellule infectée : leur ARNm est pourvu d'une séquence IRES et leur traduction peut donc être initiée sans les facteurs dépendants de la coiffe. On comprend dès lors que des altérations de ces mécanismes puissent participer à l'oncogenèse.

Dans le myélome multiple, une augmentation de l'expression de MYC a pu être attribuée à une mutation de la séquence 5'UTR du messenger de cette protéine, au niveau de son IRES : cette mutation stabiliserait l'IRES et faciliterait la traduction qui en dépend. De façon générale, la recherche de mutations dans les sites IRES des gènes codant pour des oncoprotéines comme p53 pourrait se révéler fructueuse. Par ailleurs, des facteurs protéiques appelés ITAF (*Internal initiation trans-acting factors*) sont nécessaires pour l'initiation de la traduction au niveau d'IRES, de façon plus ou moins spécifique du messenger considéré. Des altérations qualitatives ou quantitatives de ces protéines pourraient jouer un rôle dans la traduction dépendante des IRES et être impliquées dans l'oncogenèse : c'est le cas du facteur EIF4G1 dont la surexpres-

sion serait à l'origine de la surproduction de δ -caténine, une protéine d'adhésion cellulaire *via* sa liaison avec la cadhérine E. Cette surexpression a été observée dans une proportion élevée de cancers du sein métastatiques et jouerait un rôle dans les phénomènes d'invasion.

Conformation des protéines, interactions protéine-protéine

La conformation des protéines et sa régulation

Les protéines sont faites de séquences linéaires d'acides aminés enchaînés les uns aux autres par des liaisons covalentes. La séquence des acides aminés d'une protéine (que l'on appelle sa structure primaire) est déterminée par la séquence des nucléotides de l'ADN des gènes, *via* l'information transmise par les ARN messagers. Cette séquence protéique suffit à elle seule à caractériser de façon univoque la protéine ; pourtant, rien ne pourrait être déduit de cette séquence quant aux fonctions de la protéine si l'on ne connaissait pas sa structure dans l'espace. Cette structure est déterminée par la séquence de ses acides aminés, mais fait intervenir de nombreuses forces d'interaction entre les chaînes latérales des acides aminés de cette séquence, de sorte que les logiciels les plus sophistiqués ne sont que très partiellement capables, à l'heure actuelle, de prédire la structure spatiale de la protéine. Ils sont capables de prédire certains agencements des acides aminés, sur des séquences de quelques dizaines d'acides aminés (hélice α , feuillet plissé β), que l'on appelle structure secondaire, mais la disposition de ces domaines les uns par rapport aux autres (structure tertiaire) ne peut être connue que grâce à des techniques physiques complexes comme la diffraction des rayons X par une forme cristalline de la protéine.

Les protéines sont synthétisées de façon linéaire ; à cette synthèse fait suite progressivement le repliement (*folding*) de la protéine, qui fait intervenir ces forces d'interaction non covalentes, auxquelles s'ajoutent les ponts disulfure formés entre deux résidus cystéine de la chaîne polypeptidique par une PDI (*Protein disulfide isomerase*), qui créent une importante stabilisation à la structure tridimensionnelle des protéines. Ces liaisons non covalentes peuvent être :

- des liaisons de caractère ionique entre une charge positive portée par un acide aminé basique (lysine, arginine, histidine) et une charge négative portée par un acide aminé acide (acides glutamique et aspartique) ;
- des forces de Van der Waals, de caractère électrostatique, s'exerçant entre des fractions de charges, soit permanentes, soit induites par des interactions entre atomes voisins ;
- des liaisons hydrogènes entre acides aminés porteurs de fonctions polarisées exerçant des attractions ou des répulsions selon leur richesse en électrons (sérine, thréonine, cystéine, proline, etc.) ;
- des liaisons « hydrophobes » qui se manifestent en fait par des interactions privilégiées entre des résidus aliphatiques et aromatiques (apolaire) excluant la présence d'eau (glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine).

Le repliement de la protéine lui fait adopter, en principe, un état minimisant le niveau d'énergie libre final ; toutefois, la longueur des chaînes et la complexité des interactions ne peuvent se résoudre en un simple calcul du niveau énergétique minimal ; le repliement est également fonction de « l'histoire » de la synthèse, de l'ordre dans lequel les acides aminés sont ajoutés, et des interactions nouées au fur et à mesure de cette synthèse. On sait depuis plus d'un siècle que le chauffage, par exemple, fait perdre la structure spatiale des protéines : des liaisons sont rompues, et le refroidissement, même progressif, ne permet généralement pas de récupérer la structure native de la protéine, qui est indispensable à sa fonction. Il existe des anomalies du repliement de certaines protéines qui conduisent à leur agrégation et à leur insensibilité aux systèmes de protéolyse ; on les rencontre dans certaines maladies neurodégénératives. Dans certains cas, ces agrégats protéiques ont un caractère « infectieux », capable de catalyser le passage de la structure tertiaire normale vers une forme aberrante : c'est le cas de la protéine du prion, véhicule des maladies à prions (maladie de Creutzfeld-Jakob).

Le repliement optimal d'une protéine (celui qui lui permet d'acquérir sa structure tertiaire fonctionnelle) peut être guidé par des protéines « chaperones », c'est-à-dire des protéines dont la fonction est d'interagir avec la protéine en cours de synthèse pour lui faire acquérir la conformation dans l'espace qui devra être la sienne lorsqu'elle sera complète (fig. C-4). Ces protéines sont également impliquées ultérieurement dans la protection des protéines contre des stress sublétaux pouvant modifier leur structure tertiaire, comme l'hypoxie, l'acidose ou la chaleur : les protéines « mal repliées » sont prises en charge par une protéine chaperone qui lui redonne sa structure convenable (fig. C-5). Lorsque les lésions sont irréversibles, les chaperons peuvent conduire les protéines qu'ils protègent (leurs « clientes ») vers la dégradation dans le protéasome. Les chaperons appartiennent à un groupe ancestral très conservé de protéines appelées HSP (*Heat shock proteins*), classées en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 et petites HSP (15-30 kDa). Elles subissent de multiples modifications post-traductionnelles (phosphorylation, nitrosylation et acétylation). Elles travaillent en association avec des cochaperons et des molécules adaptatrices pour former des complexes de grande taille.

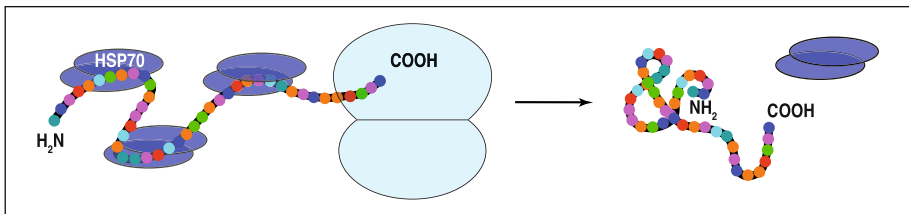


Fig. C-4 – Le repliement des protéines lors de la synthèse protéique.

Lors de la synthèse protéique, des protéines chaperones HSP70 interagissent avec les acides aminés hydrophobes de la chaîne en cours d'élongation et président à son repliement progressif pour lui faire acquérir la conformation dans l'espace qui devra être la sienne lorsqu'elle sera complète.

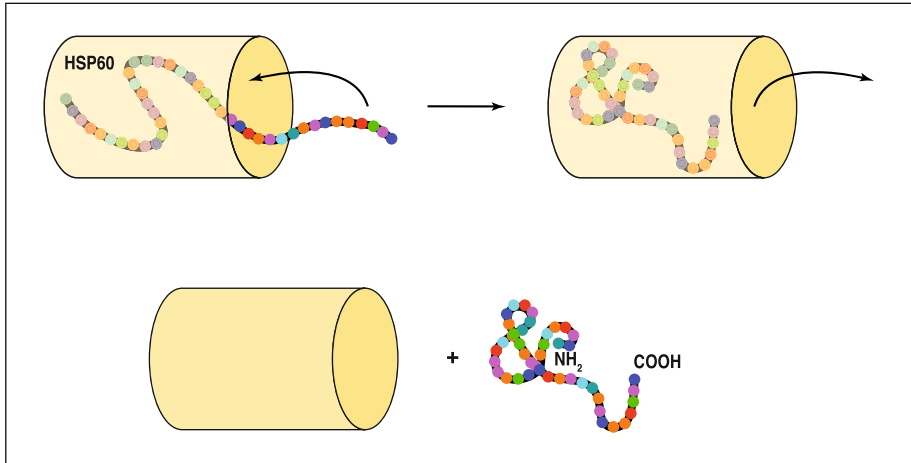


Fig. C-5 – La correction des protéines mal reliées.

Lorsqu'une protéine est mal repliée, les protéines chaperones HSP60 sont capables de les enclo-
re comme dans une coque où elles pourront retrouver leur conformation optimale.

Les HSP sont transcrites en réponse à l'action de HSF (*Heat shock factors*) qui reconnaissent sur l'ADN des séquences activatrices HSE (*Heat shock response elements*) ; la transcription et la maturation des messagers sont d'autant plus rapides que les gènes des HSP ne comportent pas d'introns. Il existe trois HSF chez l'homme, HSF1, 2 et 4. Le facteur de transcription HSF1 est maintenu inactif par sa liaison avec la protéine HSP90 ; il s'en détache sous l'effet du stress, ce qui lui permet de migrer dans le noyau et de se trimériser pour induire la transcription des HSP. La mise en œuvre des HSP se fait selon un processus complexe (fig. C-6). Les protéines « clientes » sont recrutées par un complexe entre HSP70 et une cochaperone HSP40, liées entre elles par une molécule adaptatrice HOP (*HSP organizing protein*). L'ensemble se lie alors à un dimère de protéine HSP90 lié à l'ADP. Un échange ADP-ATP, activé par une protéine adaptatrice AHA1 (*Activator of HSP90 ATPase 1*), permet un changement de conformation et assure la protection de la protéine cliente afin qu'elle puisse exercer ses fonctions. À défaut de cet échange d'ATP, la protéine cliente est couplée à l'ubiquitine et conduite vers le protéasome.

De nombreuses protéines impliquées dans la prolifération et la survie cellulaires sont des clientes des HSP : des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) comme EGFR, ERBB2, KIT et MET (chapitre 1), des kinases intracellulaires comme B-RAF, AKT et CDK4 (chapitres 2, 3 et 17), des facteurs de transcription comme p53, HIF1 α ou le récepteur des œstrogènes, ou encore des protéines comme APAF1, BCL2 (chapitre 18) et la télomérase (Annexe A). Les protéines HSP vont permettre à ces protéines de supporter les conditions hypoxiques et acides du milieu intérieur tumoral ; elles vont même leur permettre de tolérer les variations génétiques oncogéniques qui pourraient leur être fatales. Les protéines HSP sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs solides et hématologiques et elles concourent à l'oncogenèse, en

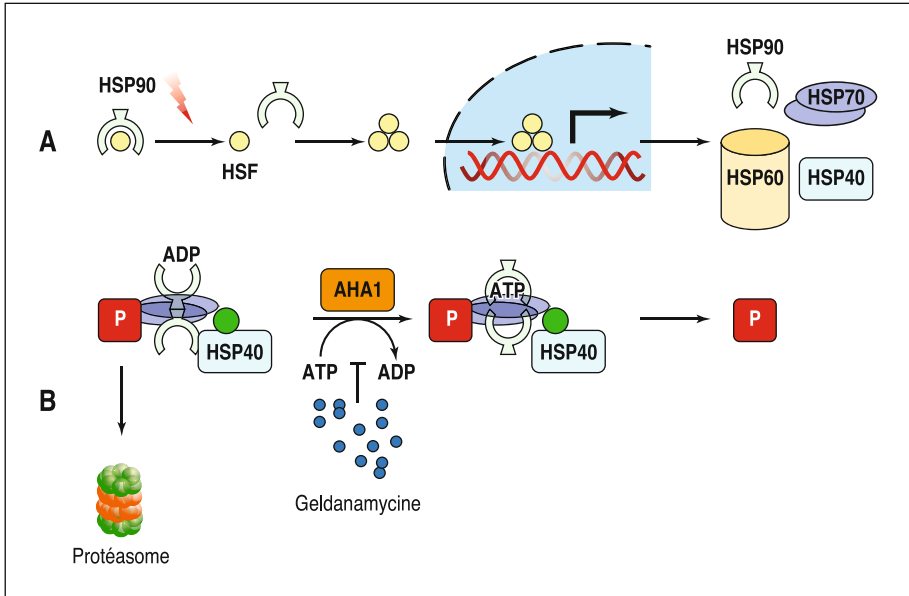


Fig. C-6 – Mise en œuvre des protéines HSP.

A. Les HSP sont transcrites en réponse à l'action de HSF. Le facteur de transcription HSF1 est maintenu inactif par sa liaison avec la protéine HSP90 ; il s'en détache sous l'effet du stress, ce qui lui permet de migrer dans le noyau et de se trimériser pour induire la transcription des HSP.

B. La mise en œuvre des HSP se fait selon un processus complexe : les protéines « clientes » sont recrutées par un complexe entre HSP70 et une cochaperone HSP40, liées entre elles par une molécule adaptatrice HOP. L'ensemble se lie alors à un dimère de protéine HSP90 lié à l'ADP. Un échange ADP-ATP, activé par une protéine adaptatrice AHA1, permet un changement de conformation et assure la protection de la protéine cliente afin qu'elle puisse exercer ses fonctions. À défaut de cet échange d'ATP, la protéine cliente est couplée à l'ubiquitine et conduite vers le protéasome. Les inhibiteurs de HSP (geldanamycine) ont pour effet d'inhiber cet échange ADP-ATP et de favoriser la destruction de la protéine cliente.

ayant une action positive sur la survie et la prolifération cellulaire. L'invalidation (knock-out) de l'HSF1 chez la souris s'accompagne d'une inhibition du développement tumoral.

Une recherche pharmacologique intense vise au développement d'inhibiteurs des HSP, en empêchant en particulier l'échange ADP-ATP qui leur permet de protéger les protéines au lieu de les entraîner vers le protéasome. La structure de base pour le blocage de l'ATP et l'inhibition des HSP est celle des ansamycines comme la geldanamycine, dont plusieurs analogues sont en développement. D'autres cibles peuvent être trouvées, par exemple au niveau des interactions de la protéine chaperone et ses cochaperones ou ses protéines clientes, ou encore au niveau des modifications post-traductionnelles des protéines chaperones. Dans la mesure où les protéines chaperones ont de nombreuses protéines clientes, l'inhibition de leur fonction peut conduire à l'interruption de nombreuses voies de prolifération et constitue une intervention multicible.

Les interactions protéine-protéine

Les interactions entre protéines font intervenir les mêmes forces d'interaction que celles déterminant leur structure tertiaire des protéines et leur repliement : liaisons ioniques, forces de Van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes. Ces liaisons non covalentes permettent aux protéines d'interagir entre elles avec une grande spécificité. L'étude des interactions protéine-protéine est devenue l'un des grands domaines de la biochimie et permet la compréhension de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques. Ce sont souvent des domaines protéiques privilégiés qui sont susceptibles d'interagir : domaine SH2 permettant à une protéine de reconnaître une phosphotyrosine portée par une autre protéine (chapitres 1 et 2), domaine PH permettant la reconnaissance entre le phosphate en 3 du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate et des kinases comme PDK1 et AKT (chapitre 3). Des techniques spéciales permettent dans certaines conditions de « piéger » l'ensemble des protéines susceptibles d'interagir avec une protéine donnée et ont permis de nombreuses découvertes. Dans les voies de signalisation, de nombreux exemples d'interaction protéine-protéine peuvent être décrits comme jouant un rôle capital dans la transmission de l'information : ce sont, pour se limiter ici à un seul exemple, de telles interactions qui sont mises en jeu dans le recrutement de SOS1 par GRB2 dans la voie des MAP kinases (chapitre 2).

Les mutations des gènes des protéines impliquées dans la prolifération ou la mort cellulaires, ou dans l'adhésion et la motilité, entraînent des modifications structurales capables de perturber les interactions protéine-protéine et de stimuler ou d'inactiver, en conséquence, la voie de signalisation dans laquelle est impliquée la protéine mutée. Pour le pharmacologue, les interactions protéine-protéine sont difficiles à cibler, en raison principalement de la large surface d'interaction entre les partenaires, impliquant de nombreuses liaisons non covalentes : les petites molécules ont du mal à inhiber ces interactions de façon spécifique et avec une affinité suffisante. L'utilisation de peptides mimant la structure d'un des domaines protéiques en interaction représente, à l'heure actuelle, la principale approche pharmacologique des interactions protéine-protéine. On peut citer, parmi d'autres, et pour poursuivre l'exemple du paragraphe précédent, le développement de peptides perturbant l'interaction entre GRB2 et SOS1 comme un moyen d'interrompre la transmission de l'information le long de la voie des MAP kinases (chapitre 2), entre le récepteur à activité tyrosine kinase et la protéine RAS.

Modifications covalentes post-traductionnelles des protéines

Hydroxylations

L'hydroxylation post-traductionnelle de résidus lysine et proline (fig. C-7A) se rencontre dans le collagène, un ensemble de protéines fibrillaires de la matrice extracellulaire. Ces hydroxylations permettent la formation de liaisons hydrogène entre les chaînes polypeptidiques et entraînent la formation de structures en triple hélice résistantes qui confèrent au collagène sa structure et sa rigidité.

Certaines hydroxylations jouent un rôle informatif important ; c'est ainsi que l'hydroxylation de résidus proline du facteur de transcription inductible par l'hypoxie HIF1 α (*Hypoxia inducing factor*, chapitre 16) permet sa reconnaissance par une E3 ubiquitine ligase, la protéine VHL (de *von Hippel Lindau disease*), qui l'entraîne vers sa destruction dans le protéasome (voir p. 307). Ces hydroxylations sont catalysées par un senseur de l'oxygène, la proline hydroxylase. Un autre senseur d'oxygène, l'asparagine hydroxylase, assure l'hydroxylation d'un résidu asparagine de HIF1 α , ce qui empêche son activation. Dans les deux cas, HIF1 α ne peut exercer son rôle de facteur de transcription de gènes nécessaires à l'angiogenèse comme celui du VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). La recherche de cibles thérapeutiques au niveau de l'inactivation du gène HIF1 α pourrait permettre de s'opposer à l'angiogenèse tumorale.

Méthylations et acétylations

Alkylations et acétylations sont des modifications post-traductionnelles fréquentes des protéines, pouvant intervenir au niveau de plusieurs résidus d'acides aminés (fig. C-7B). Les modifications des histones par des groupements méthyles ou acétyles au niveau de résidus lysine constituent un facteur important de régulation de leur activité et par conséquent du contrôle de l'expression des gènes, que nous avons décrit dans l'Annexe B. Des méthylations d'autres protéines, souvent impliquées dans la transcription comme STAT (*Signal transducer and activator of transcription*, chapitre 4), peuvent intervenir au niveau de résidus arginine, grâce à l'action de protéine-arginine N-méthyl-transférases (PMRT). Des méthylations peuvent également être mises en place par des méthyltransférases spécifiques, sur des résidus histidine, acide aspartique et acide glutamique. Dans tous les cas, le donneur de méthyle est la S-adénosylméthionine, transformée lors de cette opération en S-adénosylhomocystéine. Enfin, la méthylguanine méthyltransférase (MGMT) peut transférer sur un de ses résidus cystéine un radical méthyle provenant de l'O⁶ d'une guanine de l'ADN après une lésion de l'ADN par un agent alkylant. Cela constitue une voie de réparation directe (Annexe A) qui entraîne l'inactivation définitive de l'enzyme.

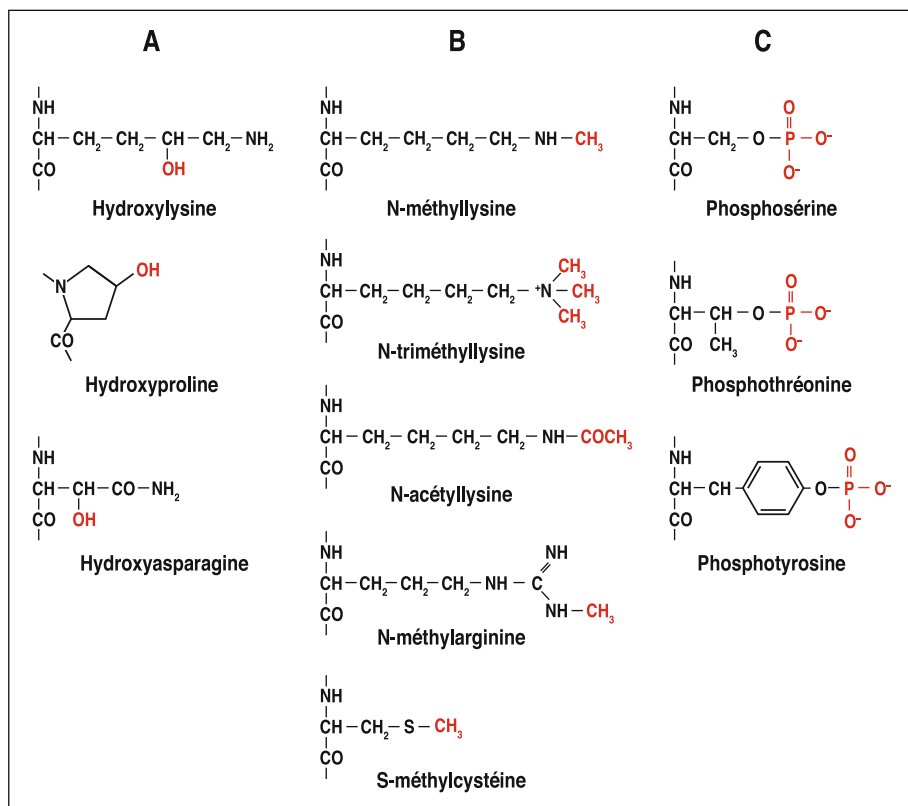


Fig. C-7 – Modifications covalentes post-traductionnelles des protéines.

A. Hydroxylations. L'hydroxylysine et l'hydroxyproline se rencontrent dans le collagène. L'hydroxylation de deux résidus proline du facteur HIF1 α constitue un signal l'entraînant vers le protéasome (chapitre 16) ; l'hydroxylation d'un résidu asparagine de ce même facteur entraîne l'inhibition de son activité transcriptionnelle.

B. Méthylations et acétylations. Ces modifications se rencontrent en particulier au niveau de résidus lysine des histones (Annexe B). La méthylation de résidus arginine se rencontre dans les facteurs de transcription en aval de certaines voies de signalisation, comme la voie JAK-STAT (chapitre 4). Enfin, la détoxification de bases méthylées de l'ADN par la MGMT entraîne la fixation du groupement méthyl sur un résidu cystéine de cette dernière (Annexe A).

C. Phosphorylation. La phosphorylation de résidus sérine, thréonine ou tyrosine de très nombreuses protéines par des kinases constitue un facteur de régulation universel de leur activité.

Phosphorylation

La phosphorylation des protéines peut intervenir au niveau de résidus sérine, thréonine ou tyrosine (fig. C-7C), qui portent une fonction hydroxylée susceptible d'être estérifiée par un acide phosphorique, apporté par une molécule d'ATP dont le phosphate en γ est transféré sur un tel acide aminé. Les enzymes assurant ces réactions de phosphorylation sont des kinases ; on distingue les sérine/thréonine kinases (428 ont été identifiées dans le génome humain) et les tyrosine kinases (90 dans le génome

humain) ; quelques rares kinases sont « duales » et capables de phosphoryler des résidus sérine ou thréonine aussi bien que des résidus tyrosine. Certaines ont également une fonction de lipide kinase, et sont capables de phosphoryler un phosphoinositide (chapitre 3). L'ensemble des protéine kinases forme ce que l'on appelle le kinome. Les phosphatases font le travail inverse des kinases : elles hydrolysent la liaison ester phosphorique et libèrent un groupement phosphate ; on distingue les sérine/thréonine phosphatases des tyrosine phosphatases – et les lipides phosphatases – sur la même base que l'on distingue les kinases.

La phosphorylation de protéines substrats est au cœur de la transduction des messages apportés par les facteurs de croissance ; de façon générale, la phosphorylation des protéines est un des principaux modes de régulation de leur activité. Le groupement phosphate porté par une protéine, parfois un lipide, constitue, dans bien des systèmes de signalisation, le message lui-même. On recherchait systématiquement, dans les années 1960, le second messenger de l'action de certaines hormones comme l'insuline, après que l'on eut identifié l'AMP cyclique et le triphosphoinositol comme seconds messagers du glucagon ou de l'adrénaline. Dans les systèmes de transduction, c'est souvent le groupement phosphate lui-même, porté par une tyrosine ou par un phosphoinositide, qui est le « second messenger ». De nombreux exemples de kinases ont été présentés dans les voies de signalisation : récepteurs à activité tyrosine kinase (chapitre 1), ou à activité sérine/thréonine kinase (chapitre 5), tyrosine kinases cytoplasmiques, sérine/thréonine kinases du cycle cellulaire (chapitre 17), de la voie des MAP kinases (chapitre 2) ou de la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), etc. Il en est de même des phosphatases : CDC25 du cycle cellulaire (chapitre 17), PTEN de la voie de la PI3 kinase (chapitre 3), etc.

La phosphorylation intervient au niveau de résidus bien spécifiques de la protéine substrat. Par exemple, la kinase AKT1 est phosphorylée sur le résidu T308 par la kinase PDK1 et sur le résidu S473 par la kinase MTOR (chapitre 3). Elle fait intervenir souvent une reconnaissance spécifique entre le site actif de l'enzyme et le site substrat, encore que, dans certains cas, plusieurs sites peuvent être phosphorylés par la même kinase : on peut en trouver des exemples dans l'autophosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase (chapitre 1). La phosphorylation crée, au niveau de l'acide aminé phosphorylé, une forte charge négative qui va modifier de façon considérable les interactions ioniques au niveau de la protéine elle-même (changement de conformation) comme au niveau de ses interactions avec d'autres protéines. Certaines mutations sont dites « phosphomimétiques » lorsqu'elles remplacent un acide aminé neutre par un acide aminé chargé négativement, au voisinage d'un acide aminé hydroxylé ; un exemple d'une mutation phosphomimétique oncogénique est celui de la protéine B-RAF (chapitre 2).

Glycosylation

De très nombreuses protéines portent des chaînes glucidiques qui sont branchées soit sur un résidu asparagine, par une liaison N-osidique (N-glycoprotéines, fig. C-8A et C), soit sur un groupement hydroxyle porté par une sérine, une thréonine ou une

hydroxylysine, par une liaison O-osidique (O-glycoprotéines, fig. C-8B et D). Les chaînes glucidiques des glycoprotéines (glycanes) sont généralement ramifiées grâce aux multiples fonctions osidiques portées par les glucides. Les protéines membranaires portent souvent de tels glycanes qu'elles exposent vers l'extérieur de la cellule ; ces glycanes vont jouer un rôle antigénique qui, en cas d'altération, pourra servir de marqueur de certaines maladies, en particulier les cancers. Pour ne citer qu'un exemple, les déterminants des groupes sanguins et tissulaires sont portés par des structures glucidiques ainsi exposées à la surface des cellules sanguines circulantes.

Dans le cas des N-glycoprotéines, le site de glycosylation est toujours constitué des trois acides aminés S/T-X-N, et le sucre lié à l'asparagine est toujours la N-acétylglucosamine. La réaction de glycosylation se fait dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) : les sucres sont d'abord ajoutés successivement, dans un ordre précis, avec des ramifications au niveau de résidus mannose, sur une molécule phospholipidique volumineuse insérée dans la membrane du RE, le dolichol-pyrophosphate. Ils sont apportés sous une forme activée par une liaison avec un nucléotide spécifique

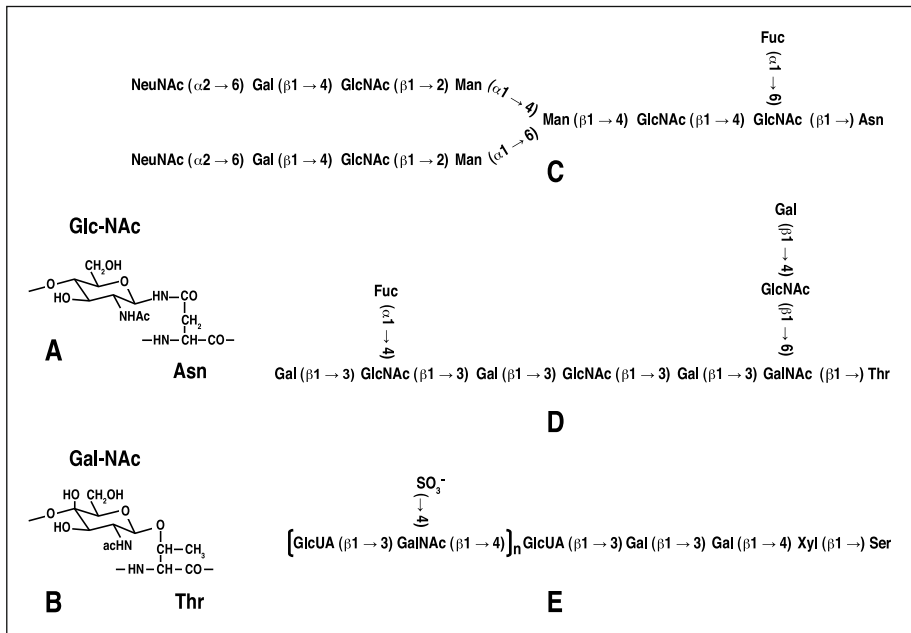


Fig. C-8 – Modifications covalentes post-traductionnelles des protéines : glycosylations.

- Liaison N-osidique entre un résidu asparagine et une β-N-acétyl D-glucosamine.
- Liaison O-osidique entre un résidu thréonine et une β-N-acétyl D-galactosamine.
- Enchaînement des oses et osides dans un glycanes d'une N-glycoprotéine, la lactotransferrine.
- Enchaînement des oses et osides dans un glycanes d'une O-glycoprotéine de membrane, caractéristique de l'antigène de Lewis^a.
- Structure d'un glycosaminoglycane, la chondroïtine sulfate A, lié par l'intermédiaire d'un β-D-xylose à un résidu sérine d'une chaîne polypeptidique, l'ensemble constituant un protéoglycane. Le motif caractéristique répété *n* fois est constitué d'acide D-glucuronique et d'une β-N-acétyl D-galactosamine sulfatée en 4.

(UDP, CMP, GDP) et chaque addition est catalysée par une glycosyltransférase distincte. La chaîne glycanique est ensuite transférée en bloc, par une oligosaccharyl transférase, sur une protéine possédant un site de glycosylation faisant saillie au niveau de la lumière du RE. Les protéines strictement cytosoliques ne sont jamais glycosylées. La chaîne glycosidique de la protéine est ensuite remaniée lors de la maturation de la glycoprotéine et son transfert vers l'appareil de Golgi, puis vers sa destination ultime ; certains sucres, comme le glucose, sont enlevés, d'autres sont ajoutés, en particulier des sucres comme l'acide N-acétylneuraminique, le galactose et le fucose, qui vont donner à la glycoprotéine ses propriétés caractéristiques, en particulier antigéniques. Un exemple de structure N-glycanique d'une glycoprotéine est donné figure C-8C.

Dans le cas des O-glycoprotéines (fig. C-8D), les sucres sont ajoutés directement sur la protéine, de façon séquentielle. Ils sont apportés sous forme activée par un nucléotide et ajoutés séquentiellement par les glycosyltransférases spécifiques, sans l'intervention d'un dolichol. Dans le cas des mucines, la partie extracellulaire de la protéine transmembranaire porte de multiples chaînes glycaniques comme des épines sur une tige. À rapprocher de ces glycoprotéines sont les protéoglycanes, qui constituent eux aussi des agencements entre une chaîne polypeptidique et des osides liés à la protéine par une liaison O-osidique ; dans ce cas, la structure glucidique est faite d'un enchaînement linéaire monotone d'un acide uronique et d'une N-acétylglucosamine (fig. C-8E), enchaînement qui porte le nom de glycosamino-glucuronoglycane (GAG). Ces structures, dont le poids moléculaire peut être très élevé, peuvent porter des groupements sulfate qui leur confèrent des charges négatives (héparane sulfate, chondroïtine sulfate, etc). Alors que les glycoprotéines sont porteuses d'une information liée à l'enchaînement précis des osides constitutifs, les protéoglycanes jouent surtout un rôle structural, mais peuvent faciliter la transmission de messages apportés par les facteurs de croissance.

De nombreuses altérations des chaînes glucidiques des protéines sont rencontrées dans les cellules tumorales. La plupart sont sans doute des conséquences de la transformation maligne, mais certaines peuvent jouer un rôle déterminant dans l'oncogénèse. Le passage, inconstant, de glycoprotéines tumorales dans la circulation peut être utilisé pour le suivi de l'évolution tumorale (CA125 pour les cancers de l'ovaire, CEA pour les cancers du côlon, etc.). Les altérations structurales des glycoprotéines peuvent également servir de cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers. Un phénomène fréquemment observé dans les cellules tumorales est une complexification des glycanes portés par les N-glycoprotéines, lié à l'hyperactivité d'enzymes (β 1,6-N-acétylglucosaminyl-transférase 5 ou GNT5, sialyltransférase) et à un enrichissement subséquent en acide sialique et en fucose, situés à l'extrémité des ramifications des glycanes. Cette richesse en acides sialiques pourrait être un facteur favorisant la dissémination métastatique en réduisant les interactions cellule-cellule dans lesquelles sont impliqués ces acides sialiques terminaux. Par ailleurs, les cellules cancéreuses d'origine épithéliale présentent souvent des altérations des mucines, caractérisées par une troncation des glycanes conduisant à de nouveaux épitopes antigéniques. Toutefois, il n'existe pas d'altérations simples et constantes permettant de différencier un tissu tumoral donné du tissu normal correspondant.

Ces particularités des cellules tumorales, jointes au caractère antigénique des glycanes exposés à la surface des cellules, ont suscité d'abondantes recherches de thérapeutiques de type vaccinal afin de sensibiliser le système immunitaire contre les glycoprotéines altérées des cellules tumorales, en particulier la mucine 1 (MUC1) des cancers de la prostate. Certains anticorps dirigés contre des épitopes glycaniques de cellules malignes sont également développés. Enfin, on peut envisager de cibler la sialylation terminale des glycanes en utilisant des oligosaccharides servant de leurres aux sialyltransférases, ou encore des inhibiteurs des sialyltransférases ou de la N-acétylglucosaminyltransférase.

Greffage de groupements lipidiques

Plusieurs types de substituants lipidiques peuvent être fixés de façon covalente sur les protéines (fig. C-9). Ces substituants permettent à la protéine de s'ancrer dans les membranes, en particulier la membrane plasmique, grâce aux interactions hydrophobes s'exerçant entre les chaînes aliphatiques des phospholipides membranaires et celles liées de façon covalente aux protéines. Cet ancrage peut être indispensable aux fonctions de la protéine et peut lui servir à « recruter » au niveau de la membrane des protéines avec lesquelles elle interagit. Un exemple classique en oncologie est celui de la protéine RAS, qui possède deux types de liaisons covalentes avec une molécule lipidique (chapitre 2). Un autre exemple est celui de la protéine Hedgehog (chapitre 9), également liée à deux molécules lipidiques par liaisons covalentes. Enfin, la sémaphorine 7 (chapitre 10) offre un exemple de protéine liée à la membrane par une ancre glycolipidique.

Un premier type de substituant est constitué par les acides gras, surtout myristique (acide gras saturé à quatorze atomes de carbone) et palmitique (acide gras saturé à seize atomes de carbone). Le premier se lie par une liaison amide à la glycine N-terminale d'une protéine ; le second se lie par une liaison thioester à une cystéine interne de la protéine. Un deuxième type de substituant est constitué par des polyisoprènes : groupement farnésyl à quinze atomes de carbone (trois maillons isoprène), groupement géranylgeranyl à vingt atomes de carbone (quatre maillons isoprène). Ces groupements, apportés sous forme pyrophosphate, sont attachés à une cystéine de la chaîne polypeptidique par une liaison thioéther grâce à des transférases spécifiques. Un troisième type de liaison covalente entre une protéine et un lipide est constitué par la liaison d'une molécule de cholestérol au niveau de l'acide aminé C-terminal d'une protéine (liaison ester). Enfin, certaines protéines peuvent être liées de façon covalente à une molécule de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) ; cette réaction se déroule dans le RE et vient remplacer l'extrémité C-terminale de la protéine par une « ancre » glyco-phospholipidique.

Une approche thérapeutique dirigée contre la prénylation des petites protéines G a été développée en vue d'inhiber la farnésylation de RAS, indispensable à son insertion membranaire et à son rôle d'activation de la voie des MAP kinases (chapitre 2). Cette approche n'a pas permis d'aboutir à des inhibiteurs de prénylation capables d'inhiber RAS, mais dont l'activité vis-à-vis d'autres petites protéines G comme RHO-A pourrait se révéler intéressante en oncologie.

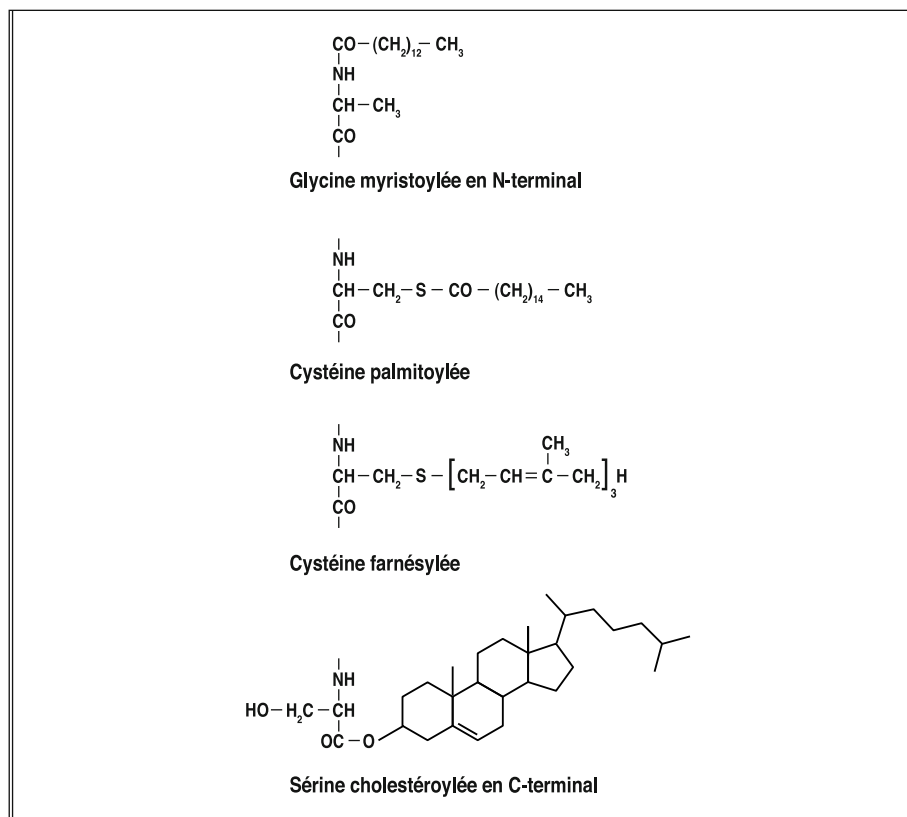


Fig. C-9 – Modifications covalentes post-traductionnelles des protéines : liaison aux lipides. L'acide myristique est lié à un résidu glycine N-terminal de certaines protéines comme les sous-unités α de protéines G hétérotrimériques (chapitre 6) par une liaison amide. L'acide palmitique est lié à un résidu cystéine de certaines protéines comme RAS (chapitre 2) ou Hedgehog (chapitre 9) par une liaison thioester. Le groupement farnésyl est lié à un résidu cystéine de certaines protéines comme RAS (chapitre 2) par une liaison thioéther. Une molécule de cholestérol est liée à un résidu sérine C-terminal de la protéine Hedgehog (chapitre 9) par une liaison ester.

Poly(ADP-ribose)ylation

L'addition de groupements de poly(ADP-ribose), provenant du NAD, sur des résidus d'acide glutamique des protéines a été évoquée dans l'Annexe A. Au-delà du rôle de la poly(ADP-ribosyl)ation dans la réparation de l'ADN, ces modifications covalentes se rencontrent dans de nombreuses situations et constituent un mode important de régulation de l'activité des protéines.

Nitrosylation

L'addition du radical NO_o sur l'atome de soufre de résidus cystéine de certaines protéines (chapitre 16) est un des mécanismes par lequel l'oxyde nitrique contrôle l'activité de ces protéines, tantôt en les activant (cas de RAS), tantôt en les inhibant (cas de la caspase 3).

Localisation subcellulaire des protéines

Les protéines sont synthétisées dans le cytoplasme, mais elles doivent agir ensuite dans des compartiments cellulaires précis ou encore être sécrétées. La relocalisation (« routage ») des protéines constitue une étape essentielle pour l'exercice de leurs activités. Cette relocalisation est permise par des signaux d'adressage constitués par des « séquences signal » présentes dans la structure primaire de la protéine. Il existe ainsi des séquences signal permettant l'importation des protéines dans les divers compartiments mitochondriaux ; longues de vingt à cinquante acides aminés au niveau N-terminal, ces séquences permettent la reconnaissance et le transport des protéines, guidées par une protéine chaperon (HSP70), par des complexes multiprotéiques appelés translocases mitochondriales. L'une d'elles, la TOM (*Translocase of the outer membrane*), lui permet d'atteindre le fluide intermembranaire et deux autres, les TIM (*Translocase of the inner membrane*), lui permettent d'atteindre la membrane interne ou la matrice mitochondriale. Les protéines sont ensuite débarrassées de leur séquence signal par une peptidase et elles acquièrent leur conformation définitive grâce à des protéines chaperones mitochondriales (fig. C-10).

Les protéines à localisation nucléaire portent une séquence signal de localisation nucléaire NLS (*Nuclear localisation signal*), riche en acides aminés basiques. L'activation de facteurs de transcription, qui peuvent être associés dans le cytosol à diverses protéines de signalisation, est liée à leur possibilité, sous certaines conditions, en particulier de phosphorylation, de migrer vers le noyau afin de promouvoir la transcription de leurs gènes cibles ; on peut citer les protéines STAT (chapitre 4), et SMAD (chapitre 5), la β -caténine (chapitre 7), le récepteur NOTCH tronqué (chapitre 8), les protéines GLI (chapitre 9), le NF κ B (chapitre 12). Les protéines à destinée nucléaire sont reconnues dans le cytoplasme par des protéines réceptrices (importines) qui font la navette entre cytoplasme et noyau (fig. C-10) grâce à leurs propriétés de reconnaissance des nucléoporines, protéines constitutives des pores nucléaires NPC (*Nuclear pore complex*). Une fois dans le noyau, le complexe importine – protéine transportée est dissocié grâce à l'intervention de RAN (*RAS-related nuclear protein*), une petite protéine G qui se lie à l'importine quand elle a fixé le GTP ; après libération dans le noyau de la protéine transportée, l'ensemble RAN – transporteur repasse dans le cytoplasme. RAN hydrolyse alors le GTP, se sépare du transporteur qui peut alors effectuer un nouveau cycle de transport d'une protéine possédant un NLS.

Certaines protéines sont directement synthétisées au niveau du RE sur lequel peuvent se fixer les polysomes. Elles peuvent alors soit passer entièrement dans la lumière du RE si elles sont solubles, soit rester enchâssées dans la membrane du RE

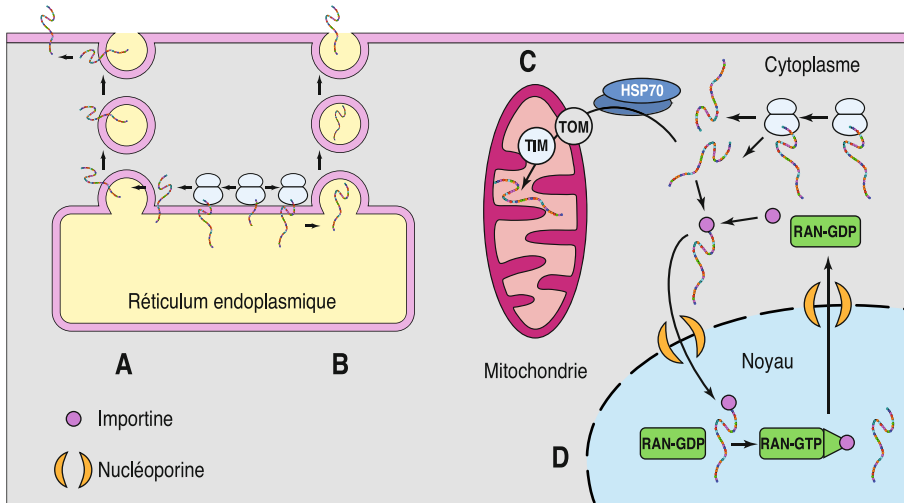


Fig. C-10 – Translocation des protéines.

La synthèse protéique est suivie de la translocation des protéines vers les compartiments où elles doivent assurer leur fonction, grâce à des domaines structuraux de localisation.

A. La synthèse protéique au niveau des ribosomes associés au réticulum endoplasmique permet leur insertion dans la membrane plasmique après contact entre la membrane du réticulum endoplasmique et la membrane plasmique.

B. Cette synthèse permet également la sécrétion des protéines vers l'extérieur de la cellule lorsqu'elles n'ont pas de domaine transmembranaire.

C. La synthèse protéique dans le cytosol permet l'exportation de protéines dans la mitochondrie, qu'elles atteignent grâce à des transporteurs localisés au niveau de la membrane externe (TOM) et au niveau de la membrane interne (TIM).

D. Cette synthèse permet également l'exportation de protéines vers le noyau ; après couplage avec une importine, elles sont capables de franchir la membrane nucléaire grâce à des protéines de la membrane nucléaire appelées nucléoporines. Une petite protéine G, RAN, est capable de se lier à l'importine quand elle est liée au GTP ; elle peut alors traverser la membrane nucléaire, hydrolyser le GTP, libérer l'importine et retourner dans le noyau.

dans le cas contraire. Le RE sert de point d'entrée de ces protéines vers les autres systèmes membranaires de la cellule, appareil de Golgi, endosomes, membrane plasmique. La fixation des polysomes sur le RE est permise par la reconnaissance, dès le début de la synthèse de la protéine, d'une séquence signal par un complexe ribonucléoprotéique appelé SRP (*Signal recognition particle*) qui permet à la chaîne en cours d'élongation de se localiser d'emblée dans la lumière du RE. Cette séquence signal est clivée dans le cas des protéines solubles, qui se retrouvent alors entièrement dans la lumière du RE où elles seront prises en charge par une protéine chaperon qui assure leur repliement fonctionnel. Les protéines transmembranaires conservent une ou plusieurs séquences en hélice α traversant la membrane du RE et gagnent ensuite leur site définitif dans cette configuration.

La localisation des protéines dans le bon compartiment (celui où elles doivent assurer une fonction précise à un moment précis) constitue un mode important de régulation de leur activité. C'est ainsi que la β -caténine, si elle n'est pas phosphorylée par le complexe des kinases en raison d'une mutation de la protéine APC (chapitre 7), migre dans le noyau où elle active des gènes de prolifération. Un autre exemple est fourni par p53, dont certaines mutations empêchent la localisation nucléaire (chapitre 17). Il en est de même pour p21^{CIP1} ou pour p27^{KIP1} (chapitre 17) dont la mauvaise localisation cytoplasmique empêche l'action inhibitrice des complexes cycline-CDK. À l'inverse, une importation excessive de NF κ B (chapitre 12) dans le noyau est un événement oncogénique. Des peptides à visée thérapeutique visant à inhiber sa séquence de localisation nucléaire ont été développés.

Le stress du réticulum endoplasmique et l'*unfolded protein response*

Dans le cas des protéines synthétisées au niveau du RE, certaines conditions du milieu (acidité, hypoxie, manque de glucose) conduisent à des anomalies du repliement des protéines et à des conséquences appelées l'*unfolded protein response* (UPR), terme que nous ne traduirons pas. Elle consiste en la mise en œuvre de signaux d'adaptation et d'alarme qui ont pour but de rétablir l'homéostasie cellulaire et de se débarrasser des protéines mal repliées. L'UPR a pour effet d'activer diverses voies de signalisation : la voie de la JNK (*JUN kinase*) et la voie de la p38 (chapitre 2) par exemple, ou les voies aboutissant au NF κ B (chapitre 12). Une des conséquences de l'UPR est le phénomène d'autophagie, qui permet à la cellule de survivre au stress, mais peut entraîner la mort de la cellule.

Le point de départ de l'UPR est l'activation de protéines transmembranaires dont l'extrémité C-terminale est localisée dans le cytosol et l'extrémité N-terminale dans le RE, dans lequel elles sont liées à une protéine chaperone particulière, la GRP78 (*Glucose-regulated protein, 78 kDa*). L'accumulation de protéines mal repliées entraîne l'oligomérisation de ces protéines, qui conditionne leur activation. Parmi ces protéines ont été identifiées l'IRE1 (*Inositol-requiring kinase 1*) ou ERN1 (*Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1*), la PERK (*PRKR-like ER kinase*) ou EIF2AK3 et l'ATF6 (*Activating transcription factor 6*). Leur activation permet le recrutement de protéines chaperones pour prendre en charge les protéines mal repliées, l'arrêt de la traduction des messagers et le rétrotransport des protéines vers le cytosol où elles pourront être ubiquitinylées et dégradées dans le protéasome (voir p. 307) ou encore détruites par autophagie.

La protéine IRE1 possède à la fois une activité sérine/thréonine kinase et une activité d'endoribonucléase ; cette dernière a pour substrat l'ARN messager d'une protéine XBP1 (*X-box-binding protein 1*) et assure sa maturation en vue de sa traduction. Celle-ci est un facteur de transcription qui, hétérodimérisé avec le facteur NFY, active la transcription des nombreux gènes nécessaires à l'UPR. L'activité kinase permet l'activation d'une MAP3K particulière, ASK1 (*Apoptosis signal-regulating*

kinase 1, chapitre 2), qui initie la cascade de deux MAP kinases, la JNK et la p38. Les protéines pro-apoptotiques BAK et BAX (chapitre 18) interagissent directement avec IRE1 et l'activent, démontrant une interconnexion entre l'apoptose et l'UPR.

La protéine PERK est aussi une sérine/thréonine kinase dont l'activité est révélée par son oligomérisation suivie d'une autophosphorylation. Elle phosphoryle et inactive le facteur d'élongation EIF2 α , ralentissant ainsi le processus de traduction et réduisant globalement la synthèse protéique. Toutefois, cette phosphorylation d'EIF2 α a un effet inverse sur le messenger d'un facteur de transcription appelé ATF4 (*Activating transcription factor 4*) dont les gènes cibles sont les protéines chaperons GRP78 et GRP94, ainsi que des gènes impliqués dans la protection contre le stress oxydatif, la synthèse du glutathion et l'induction de l'autophagie, comme celui de la protéine CHOP (*C/EBP homologous protein*). Cette dernière est un facteur de transcription phosphorylé par une MAP kinase p38 ou JNK (chapitre 2) impliqué dans le déclenchement de l'apoptose *via* l'activation de la transcription de la protéine *BH3 only* BIM et la répression de celle de la protéine anti-apoptotique BCL2 (chapitre 18).

La protéine ATF6 est également un facteur de transcription ; son activation est réalisée lorsqu'elle est libérée de la GRP78 et peut migrer vers l'appareil de Golgi, où elle est activée par protéolyse, passe alors dans le cytosol, d'où elle gagne le noyau pour exercer ses fonctions d'activation de la transcription de gènes, en particulier la protéine XBP1 dont le messenger est mûré spécifiquement par IRE1. Parmi les gènes cibles d'ATF6 figurent la GRP78, la PDI (*Protein disulfide isomerase*), la protéine CHOP et la protéine EDEM1 (*ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein 1*), qui permet d'augmenter l'activité de protection du RE à l'égard des protéines mal repliées ou leur dégradation.

Le stress du réticulum endoplasmique (RES) est associé à de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives ou le diabète, mais aussi au cancer. L'hypoxie, l'hypoglycémie qui caractérisent les zones centrales des tumeurs induisent un tel stress qui met en jeu les mesures de protection de l'UPR. Il a été observé que les protéines GRP78 et XBP1, par exemple, sont surexprimées dans les régions hypoxiques des tumeurs. Il existe une possibilité d'intervention pharmacologique visant à empêcher les tumeurs de s'adapter ainsi à un environnement hostile. L'inhibition des activités sérine/thréonine kinases d'IRE1 ou de PERK est une première piste ; l'inhibition du recrutement de la GRP78 en réponse au stress en est une autre, et des composés ont été recherchés dans cette optique. L'interleukine 24 (IL24), qui se lie à la GRP78 et l'antagonise, a des propriétés antitumorales. Enfin, de façon indirecte, des molécules inhibitrices de protéases ou l'(ADP-ribos)ylation de protéines (Annexe A), sont capables d'induire un RES et sont à l'étude comme anticancéreux potentiels.

Clivage protéolytique

Il existe plusieurs types de clivages protéolytiques. Les uns sont cataboliques et visent à la destruction des protéines soit par les caspases effectrices dans le cadre de l'apoptose (chapitre 18), soit dans des organelles spécialisées comme le protéasome (voir

p. 307) ou le lysosome, soit encore dans le milieu extracellulaire pour détruire les protéines de la matrice extracellulaire (*Matrix metalloproteinases*, MMP). D'autres clivages sont au contraire requis pour que l'activité d'une protéine se manifeste. Ils sont assurés par divers types de protéases. Nous en donnerons quelques exemples liés à certaines manifestations de l'oncogenèse ou de l'invasion tumorale.

Les caspases initiatrices (caspases 8 et 9 tout particulièrement) sont activées par autotprotéolyse et élimination de leur prodomaine (voir chapitre 18), au niveau des plates-formes spécialisées que sont le DISC (*Death-inducing signalling complex*) et l'apoptosome, qui réalisent un agencement permettant un contact entre le domaine catalytique d'une caspase et le site de clivage d'une autre caspase. Elles activent ensuite par protéolyse les caspases effectrices comme la caspase 3, qu'elles débarrassent à leur tour de leur prodomaine. D'autres caspases, non rencontrées dans les phénomènes apoptotiques, sont susceptibles d'activer l'interleukine 1 (chapitre 12) de sorte que la caspase 1 est aussi appelée *Interleukin 1 converting enzyme* (ICE).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont également activées par protéolyse : il existe une cascade d'activités protéolytiques, partant de la cathepsine D (CTSD) qui active par clivage un pro-activateur du plasminogène pour former l'activateur du plasminogène (PLAT), qui active par clivage le plasminogène (PLG) pour former la plasmine, activant à son tour par clivage les pro-MMP pour générer collagénases, gélatinases ou stromélysines. Ces dernières sont les MMP responsables de la digestion des protéines de la matrice extracellulaire ; elles sont impliquées dans la dissémination métastatique des tumeurs, et la recherche pharmacologique vise à identifier des inhibiteurs de MMP. Un certain nombre d'entre eux se sont révélés efficaces dans des modèles précliniques, mais n'ont pas montré d'efficacité dans les essais cliniques. D'autres métalloprotéinases sont chargées de l'activation de certaines molécules de signalisation ; nous avons rencontré les protéines ADAM (*A disintegrin and metalloproteinase*) ou TACE (*TNF-alpha converting enzyme*), impliquées dans la libération des formes solubles de l'EGF à partir de leurs précurseurs membranaires (chapitre 1), ou parmi les activateurs de la voie Notch (chapitre 8).

Nous avons également rencontré la furine, qui est une pro-protéine convertase appartenant à la famille des subtilisines. Ces protéases, appelées PCSK (*Proprotein convertase subtilisin/kexin*) ou PACE (*Paired basic amino acid cleaving enzyme*), activent les formes latentes du TGF β (chapitre 5), les récepteurs NOTCH (chapitre 8) ainsi que de nombreux précurseurs d'hormones ou de molécules de signalisation : parathormone, NGF (*Nerve growth factor*), insuline, opiomélanocortine, rénine, enképhaline, dynorphine, somatostatine, gastrine, LHRH, et même l'albumine ou le facteur von Willebrand. Certaines sont responsables de l'activation par protéolyse des glycoprotéines gp160 et gp140 de l'enveloppe du virus HIV. Des altérations oncogéniques ont été décrites au niveau de ces protéines : des mutations de PCSK1 dans les tumeurs carcinoïdes, des réarrangements de PCSK7 dans les lymphomes, etc. Des inhibiteurs de protéases sont couramment utilisés dans le traitement du sida ; leur éventuelle utilité dans le traitement des cancers n'a pas été démontrée.

Les sécrétases constituent une autre classe de protéases, que nous avons également vues impliquées dans l'activation des récepteurs NOTCH (chapitre 8). Ces enzymes sont responsables du clivage du précurseur de la protéine amyloïde (APP) et contri-

buent à ce titre à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, en association avec d'autres protéines comme les présénilines ou la nicastrine. L'une d'entre elles, la cathepsine B, est surexprimée dans les adénocarcinomes de l'œsophage et d'autres tumeurs.

Ubiquitylation et protéasome

Mécanisme d'action

La protéolyse constitue un moyen essentiel de régulation de la durée de vie des protéines. Dans les cellules, il existe principalement deux systèmes de dégradation protéolytique : un système vésiculaire renfermant des protéases variées : le lysosome, et un système protéolytique multicatalytique : le protéasome. Ce dernier assure la dégradation de nombreuses protéines cellulaires, après étiquetage par un polymère de molécules d'ubiquitine, qui assure la spécificité du processus. Le système ubiquitine-protéasome est d'une part un élément de régulation de phénomènes comme l'expression des gènes, la transduction du signal, la progression du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Il permet d'autre part l'élimination des protéines mal repliées, endommagées ou mutantes, de conformation anormale, dont l'accumulation pourrait être délétère pour la cellule. Des aberrations dans cette voie conduisent à des phénotypes pathologiques qui font d'elle une cible pour une intervention thérapeutique dans les cancers.

L'ubiquitine (UB) est une protéine de soixante-seize acides aminés qui est conjuguée avec la protéine à détruire à la suite de trois réactions : une première enzyme E1 (*Ubiquitin activating enzyme*) active l'ubiquitine en fixant le résidu glycine C-terminal de celle-ci sur une cystéine du site actif de l'enzyme par une liaison thioester (fig. C-11). L'ubiquitine est ensuite transférée sur une cystéine d'une enzyme E2 (*Ubiquitin conjugating enzyme*) par transthiolation. Les enzymes E3 (*Ubiquitin protein ligase*) transfèrent enfin l'ubiquitine sur la protéine substrat à détruire grâce à une liaison amide entre le groupe carboxyl du résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine et le groupement amine d'un résidu interne de lysine de la protéine substrat. Il existe deux enzymes E1, quelques dizaines d'enzymes E2 et plusieurs centaines d'enzymes E3 qui portent la spécificité de substrat de la protéine à ubiquityler. Ce sont généralement plusieurs molécules d'ubiquitine qui sont ensuite attachées les unes aux autres par une lysine interne de chaque ubiquitine, généralement la lysine 48 (fig. C-11). Le processus se répète en utilisant la lysine 48 de l'ubiquitine fixée sur le substrat et aboutit à la formation d'une chaîne d'ubiquitines sur la molécule cible. Une chaîne d'au moins quatre ubiquitines est nécessaire pour la reconnaissance de la protéine ubiquitylée par le protéasome.

Les ubiquitine ligases (enzymes E3) appartiennent à deux familles principales, celles portant un domaine HECT (*Homologous to E6-associated protein C terminus*) et celles portant un domaine RING (*Really interesting new gene*), dont le mode d'action est différent ; pour ces dernières, le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat se fait sans liaison préalable de l'ubiquitine sur l'enzyme E3. Les ubiquitine ligases

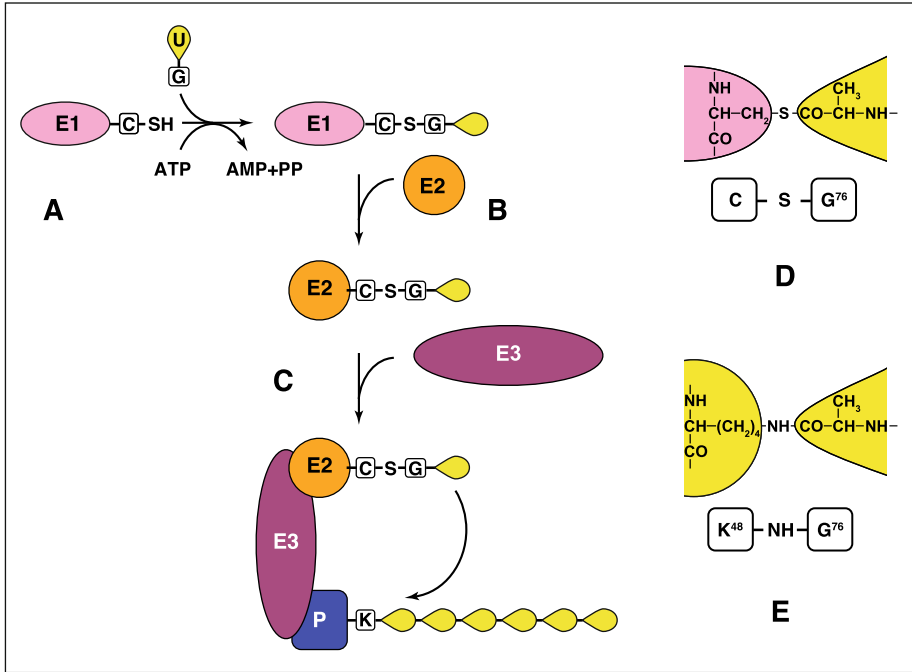


Fig. C-11 – Ubiquitinylation des protéines en vue de leur destruction.

A. Une première enzyme E1 (*Ubiquitin activating enzyme*) active l'ubiquitine en fixant le résidu glycine C-terminal de celle-ci sur un résidu cystéine du site actif de l'enzyme par une liaison thioester.

B. L'ubiquitine est ensuite transférée sur un résidu cystéine d'une enzyme E2 (*Ubiquitin conjugating enzyme*) par transthioylation.

C. Les enzymes E3 (*Ubiquitin protein ligase*) transfèrent l'ubiquitine sur la protéine substrat à détruire grâce à une liaison amide entre le groupe carboxyl du résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine et le groupement amine d'un résidu interne de lysine de la protéine substrat.

D. Liaison thioester entre la cystéine de l'enzyme E1 ou E2 et le résidu glycine C-terminal de l'ubiquitine.

E. Liaison amide (isopeptidique) entre le résidu lysine 48 d'une molécule d'ubiquitine et le résidu glycine C-terminal de la molécule d'ubiquitine suivante.

peuvent être monomériques ou multimériques, avec des sites de reconnaissance de l'ubiquitine et de la protéine substrat portés par des sous-unités différentes. La reconnaissance des protéines substrat par l'ubiquitine ligase est complexe et variable d'une protéine à l'autre. La phosphorylation constitue souvent un moyen de diriger l'ubiquitinylation : c'est par exemple le cas de la protéine p27^{KIP1} (CDKN1B) qui contrôle le cycle cellulaire (chapitre 17) ou celui de la b-caténine (chapitre 7). D'autres protéines substrats à durée de vie courte portent des domaines PEST (*Proline-glutamic acid-serine-threonine rich domains*) qui permettent leur reconnaissance par l'enzyme E3.

Le protéasome est un corpuscule de la taille d'un ribosome (26S) ; il est formé d'un complexe protéique multimérique (protéines PSM) composé de deux sous-unités principales dont l'assemblage nécessite l'ATP : la particule catalytique 20S et les particules régulatrices 19S (fig. C-12). La particule 20S séquestre les sites protéasiques à l'intérieur d'une structure cylindrique, composée de l'empilement de quatre anneaux heptamériques, deux externes, faits de sept sous-unités α , et deux internes, faits de sept sous-unités β . Ce sont ces dernières qui portent des activités thréonine-protéase qui peuvent être *chymotrypsin-like* (CTL), *trypsin-like* (TL) ou *post-glutamate peptide hydrolase* (PGPH), qui permettent la dégradation d'une large gamme de protéines en petits peptides de six à douze acides aminés. Les anneaux externes constitués des sous-unités α forment des pores étroits à chaque extrémité du cylindre, restreignant ainsi l'accès à la chambre catalytique. Cette architecture permet d'isoler les sites catalytiques et de prévenir la dégradation de protéines ne devant pas être détruites. Le complexe 19S reconnaît la chaîne de poly-ubiquitine porteuse de la protéine à détruire, clive la liaison entre le substrat et la chaîne d'ubiquitine (qui est

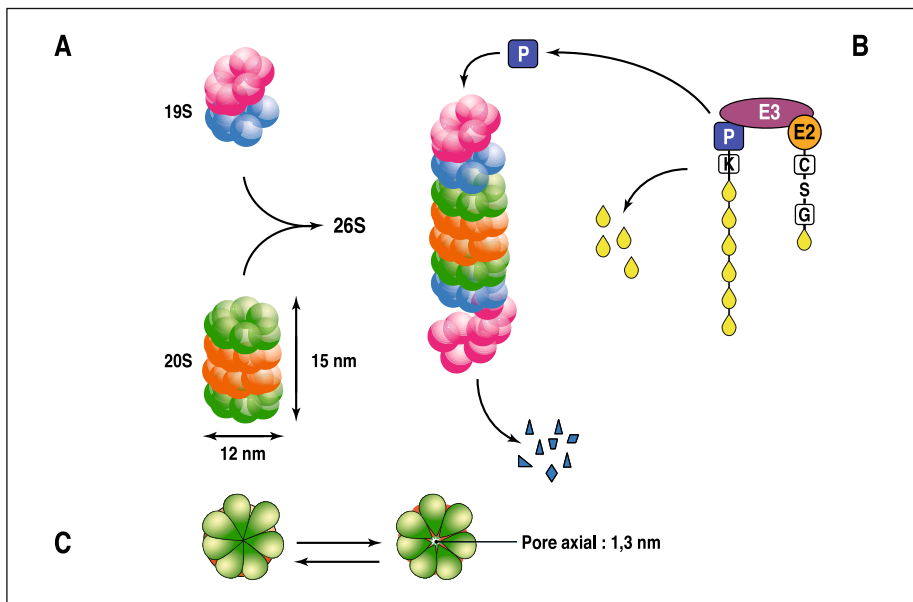


Fig. C-12 – Destruction des protéines dans le protéasome.

A. Les sous-unités 19S et 20S du protéasome s'assemblent pour former la particule 26S. La particule 19S régule l'entrée des protéines dans le cylindre constitué par la particule 20S. Cette dernière résulte de l'empilement de 4 anneaux heptamériques, deux externes (verts), faits de sept sous-unités α , et deux internes (orangés), faits de sept sous-unités β qui portent des activités thréonine-protéase.

B. La protéine ubiquitinylée est conduite par l'enzyme E3 vers le protéasome où elle est détruite. Les molécules d'ubiquitine sont recyclées. La protéine est fragmentée en peptides de 6 à 12 acides aminés.

C. La sous-unité 20S vue de dessus. Les anneaux externes forment des pores étroits à chaque extrémité du cylindre, restreignant ainsi l'accès à la chambre catalytique.

recyclée en monomères d'ubiquitine par des dé-ubiquitinyases), dénature le substrat, se lie au complexe 20S au niveau des anneaux externes et ouvre l'entrée de la chambre catalytique dans laquelle le substrat est transloqué. Ce mécanisme limite la dégradation protéique non sélective.

Altérations oncogéniques

Un grand nombre de mutations oncogéniques ou d'inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs affecte directement la voie ubiquitine-protéasome. Certains oncogènes se sont révélés être des ubiquitine ligases. L'inactivation de ces composants à la suite de mutations prévient la dégradation de certaines protéines comme des facteurs de transcription ou des facteurs angiogéniques. Alternativement, une amplification génique peut conduire à la dégradation de facteurs suppresseurs de tumeurs. Nous n'en donnerons que quelques exemples :

- le gène VHL (de *von Hippel-Lindau disease*) code pour la ligase E3 d'un facteur de transcription inductible par l'hypoxie, HIF1 α (chapitre 16). En réponse à l'hypoxie, ce facteur active l'expression de gènes comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Les mutations de VHL empêchent la dégradation de HIF en conditions normoxiques et prédisposent à la formation de lésions hypervasculaires et de tumeurs rénales ;
- le gène APC (*Adenomatous polyposis coli*) est un gène suppresseur de tumeurs qui est muté dans 70 % des cancers colorectaux. Son produit se lie à la β -caténine et contrôle son activité (chapitre 7) ; les mutations d'APC conduisent à la formation de protéines tronquées incapables de se lier à la β -caténine et donc de permettre sa phosphorylation, puis sa poly-ubiquitinylation, d'où une augmentation anormale de son activité transcriptionnelle ;
- la protéine MDM2 (*Murine double minute homolog 2*) est une ligase E3 à domaine RING qui induit l'ubiquitinylation de p53 (chapitre 17). La surexpression de MDM2, résultant d'une amplification génique, est un mécanisme responsable de l'inactivation de p53 dans plusieurs types de cancers, en particulier les sarcomes des tissus mous ;
- la protéine SMURF2 (*SMAD ubiquitinylation regulatory factor 2*) est une ligase E3 à domaine HECT qui contrôle la dégradation des SMAD de la voie du TGF β (chapitre 5). Une dégradation accélérée empêche la régulation de la prolifération cellulaire par le TGF β ;
- la protéine p27^{KIP1}, un inhibiteur de CDK2 à fonction de suppresseur de tumeurs, contrôle la transition G1/S du cycle en interagissant avec les complexes CDK2-cycline E (chapitre 17). Un des mécanismes responsables des concentrations très faibles de p27^{KIP1} retrouvées dans certaines tumeurs est sa dégradation par ubiquitinylation par une E3 ligase de la famille SCF (*Skp1/Cullin/F-box*) dont la concentration est anormalement élevée dans plusieurs types de tumeurs ;
- la plupart des cyclines sont dégradées par le protéasome après ubiquitinylation, afin qu'elles cessent rapidement leurs fonctions après le passage d'une phase à l'autre du cycle cellulaire (chapitre 17). Comme pour p27^{KIP1}, cette réaction est catalysée pour

- la cycline E par une E3 ligase de la famille SCF, dont un composant est la protéine FBXW7, dont le gène est muté dans des cancers du sein et de l'ovaire ;
- l'EGFR (chapitre 1) est le substrat d'une ligase E3 à motif RING, appelée CBL (*Casitas B-lineage lymphoma*). Son ubiquitinylation constitue un signal d'internalisation dans des vésicules endosomales, conduisant à une protéolyse des récepteurs après fusion avec les lysosomes. Les hétérodimères EGFR-ERBB2, facilités lorsque le gène ERBB2 est amplifié, sont moins sensibles à l'action de CBL que les homodimères EGFR-EGFR.

Cibles thérapeutiques

En raison de l'action du système ubiquitine-protéasome sur de multiples protéines impliquées dans les phénomènes de contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire, des interventions pharmacologiques pourraient contribuer à inhiber la prolifération des cellules tumorales, induire l'apoptose et/ou augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux. Le maintien de l'activité de protéines dégradées dans le protéasome, comme les inhibiteurs de CDK p21^{CIP1} et p27^{KIP1}, ou les agents pro-apoptotiques BAX et p53, peut être intéressant en thérapeutique anticancéreuse. Toutefois, des protéines essentielles à la prolifération comme les cyclines sont également dégradées dans le protéasome et leur stabilisation pourrait favoriser la croissance tumorale. Les recherches de composés ciblant le protéasome ont toutefois été couronnées de succès, puisqu'un inhibiteur de l'activité *chymotrypsin-like*, le bortezomib, a été mis sur le marché pour le traitement du myélome multiple et est actuellement testé dans plusieurs tumeurs solides. D'autres composés, possédant des fonctions peptidiques comme le bortezomib ou possédant une structure différente comme les catéchines, sont en cours d'étude. Le succès initial a encouragé des recherches au niveau de l'inhibition de ligases E3 qui devrait se révéler beaucoup plus sélective que l'inhibition globale du protéasome : la nutline, pour ne citer qu'un exemple, bloque le site de liaison de MDM2 et augmente la stabilité de p53.

Sumoylation

La sumoylation des protéines consiste en l'attachement, sur un résidu lysine spécifique, d'une petite protéine voisine de l'ubiquitine (*Small ubiquitin-like modifier*, SUMO). Cette modification covalente intervient dans la régulation des fonctions protéiques, de leurs interactions protéiques. Il existe trois protéines SUMO, 1, 2 et 3, qui sont activées par clivage protéolytique de leur extrémité C-terminale pour générer un motif diglycine, par une protéase appelée SENP (*Sentrin-specific protease*). La protéine activée est transférée sur une cystéine de la sous-unité 2 de la *SUMO-activating enzyme* (SAE) qui est l'équivalent de l'enzyme E1 du système d'ubiquitinylation. Elle est ensuite transférée sur l'équivalent de l'enzyme E2, appelée UBC9 (*Ubiquitin-conjugating enzyme homolog*) et enfin sur une lysine de la protéine cible, au niveau d'une séquence consensus. Les enzymes E3 permettent l'association entre

UBC9 et la protéine cible ; les enzymes E3 identifiées sont les protéines PIAS (*Protein inhibitor of activated STAT*, chapitre 4), la protéine Polycomb 2 (Annexe B) et une protéine de liaison à RAN, une petite protéine G. Une protéase SENP peut ensuite enlever le groupement SUMO de la protéine cible et permettre son recyclage.

Les protéines sumoylées les mieux connues sont des protéines du système nerveux impliquées dans des maladies neurodégénératives : la huntingtine (HTT, maladie de Huntington), l'ataxie 1 (ATXN, ataxie spino-cérébelleuse), la synucléine α (SNCA, maladie de Parkinson), la superoxyde dismutase 1 (SOD, sclérose latérale amyotrophique) et la protéine APP (*Amyloid beta precursor protein*, maladie d'Alzheimer). S'y ajoutent de nombreux facteurs de transcription, dont les protéines MYB, STAT ou HIF1 α , et des récepteurs nucléaires comme le récepteur des androgènes ou celui des œstrogènes (chapitre 14).

Des altérations de la sumoylation des protéines peuvent accompagner l'oncogénèse. Une surexpression de la protéine UBC9 est rencontrée dans plusieurs types de cancers et cette protéine peut expérimentalement augmenter la prolifération cellulaire. Certaines protéines E3 comme PIAS3 sont également surexprimées dans certains cancers. La sumoylation contrôle l'activité de plusieurs protéines oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs comme p53 et ses analogues, la protéine du rétinoblastome RB1 (chapitre 17), la protéine MDM2 (chapitre 17), etc. Enfin, la protéase SENP1 est surexprimée dans les cancers de la prostate et de la thyroïde. Les relations entre sumoylation et cancer sont encore très mal connues, mais pourraient déboucher sur un ciblage thérapeutique.

Bibliographie

Machinerie de la traduction

- Étienne J, Clauser E, Housset C, Roingard P. (2006) Biochimie génétique, biologie moléculaire. Masson, Paris; 294 p.
Weil JH. (2001) Biochimie générale, 9^e édition. Dunod, Paris; 655 p.

Repliement des protéines, protéines chaperones

- Daggett V, Fersht A. (2003) The present view of the mechanism of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4: 497-502.
Li Y, Zhang T, Schwartz SJ, Sun D. (2009) New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat*; 12: 17-27.
Whitesell L, Lindquist SL. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*; 5: 761-72.

Modifications covalentes des protéines

- Brooks SA, Carter TM, Royle L *et al.* (2008) Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies? *Anticancer Agents Med Chem*; 8: 2-21.
Dube DH, Bertozzi CR. (2005) Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*; 4: 477-88.

- Dwek MV, Brooks SA. (2004) Harnessing changes in cellular glycosylation in new cancer treatment strategies. *Curr Cancer Drug Targets*; 4: 425-42.
- Gorelik E, Galili U, Raz A. (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*; 20: 245-77.
- Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T. (2007) RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med*; 7: 777-89.
- Singh R, Bandyopadhyay D. (2007) MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*; 6: 481-6.

Localisation subcellulaire des protéines

- Davis JR, Kakar M, Lim CS. (2007) Controlling protein compartmentalization to overcome disease. *Pharm Res*; 24: 17-27.
- Dorn GW, Mochly-Rosen D. (2002) Intracellular transport mechanisms of signal transducers. *Annu Rev Physiol*; 64: 407-29.
- Gorlich D, Kutay U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 15: 607-60.
- Kau TR, Way JC, Silver PA. (2004) Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer*; 4: 106-17.

Le stress du réticulum endoplasmique et l'*unfolded protein response*

- Kim I, Xu W, Reed JC. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*; 7: 1013-30.
- Ma Y, Hendershot LM. (2004) The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer*; 4: 966-77.
- Moenner M, Pluquet O, Bouche-careilh M, Chevet E. (2007) Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res*; 67: 10631-4.
- Ron D, Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 8: 519-29.

Clivage protéolytique

- Bialas A, Kafarski P. (2009) Proteases as anti-cancer targets – Molecular and biological basis for development of inhibitor-like drugs against cancer. *Anticancer Agents Med Chem*; 9: 728-62.
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF. (2000) Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta*; 291: 113-35.
- Mohamed MM, Sloane BF. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer*; 6: 764-75.
- Murphy G. (2008) The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*; 8: 929-41.

Ubiquitylation et protéasome

- Adams J. (2004) The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer*; 4: 349-60.
- Ciechanover A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 79-87.
- Hoeller D, Dikic I. (2009) Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. *Nature*; 458: 438-44.
- Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 10: 104-15.

Nakayama KI, Nakayama K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*; 6: 369-81.

Sumoylation

Kim KI, Baek SH. (2009) Small ubiquitin-like modifiers in cellular malignancy and metastasis. *Int Rev Cell Mol Biol*; 273: 265-311.

Kim KI, Baek SH. (2006) SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells*; 22: 247-53.

Sarge KD, Park-Sarge OK. (2009) Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem Sci*; 34: 200-5.

Liste alphabétique des sigles, abréviations et acronymes

A-RAF	de Rat fibrosarcoma A	2
AATK	Apoptosis-associated tyrosine kinase	1
ABL	de Abelson leukemia virus	1
ACT	Actine	11
ACTH	Adreno-corticotrophic hormone	6
ACTN	α -actinine	11
ACVR	Activin receptor	5
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase	1 8 C
ADAP	Adhesion and degranulation-promoting adapter protein	13
ADCY	Adénylyl cyclase	6
ADD	Addiction dependence domain	18
ADOR	Adenosine receptor	15
ADP	Adénosine diphosphate	
AGO2	Argonaute 2	B
AGT	Angiotensine	6
AHA	Activator of HSP90 ATPase	C
AIB1	Amplified in breast cancer	14
AIF	Apoptosis-inducing factors	18
AKT	du nom d'un oncogène viral	3
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	1
ALK	Activin receptor-like kinase	5
ALT	Alternative lengthening of telomeres	A
AMH	Anti-Mullerian hormone	5
AMHR	Anti-Mullerian hormone receptor	5
AMP	Adénosine monophosphate	
AMPK	AMP kinase	3
ANGPT	Angiopoïétine	1
ANGPTL	Angiopoietin-like protein	1
ANK	Ankyrin repeats	8 11 12
ANT	Adenine nucleotide translocator	18

ANX	Annexine	6
API	Activator protein 1	2
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	18
APC	Adenomatous polyposis coli	7
APC	Anaphase promoting complex	17
APE	Apurinic-apyriminidic endonuclease	A
APP	Amyloid beta precursor protein	C
AR	Androgen receptor	14
AREG	Amphiréguline	1
ARF	Alternate reading frame	17
ARH	Aryl hydrocarbon receptor	14
ARNm ou mRNA	ARN messenger	C
ARNr ou rRNA	ARN ribosomique	C
ARNt ou tRNA	ARN de transfert	C
ARP2/3	Actin related protein 2/3 complex	
ASK	Apoptosis signal regulating kinase	2 3 18
ATF	Activating transcription factor	2 C
ATF	Activating transcription factor	C
ATM	Ataxia telangiectasia-mutated	17
ATP	Adénosine triphosphate	
ATPase	Adénosine triphosphatase	
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad-3 related	17
ATRA	All-trans retinoic acid receptor	14
ATXN	Ataxine	C
AURK	Aurora kinase	17
AXIN	Axine	7
AXL	de Anexelektio (« non contrôlé » en grec)	1
B-RAF	de Rat fibrosarcoma B	2
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	18
BAK	BCL2 homologous antagonist/killer	18
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog	5
BAX	BCL2-associated X protein	18
BCL suivi d'une lettre ou d'un numéro	B-cell lymphoma	18
BCR	B-cell receptor	13
BDK	Bradykinine	6
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	1
BER	Base excision repair	A
BH	BCL2 homology domain	18
BID	BH3 domain interacting death agonist	18
BIK	BCL2-interacting killer	18
BIM	BCL2-interacting mediator of cell death	18

BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>	18
BIRC	<i>Baculovirus IAP repeat containing proteins</i>	18
BLK	<i>B-lymphoid tyrosine kinase</i>	13
BLNK	<i>B-cell linker protein</i>	13
BMF	<i>BCL2 modifying factor</i>	18
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>	5
BMPR	<i>BMP receptor</i>	5
BNIP	<i>BCL2-interacting protein</i>	16
BOC	<i>Brother of CDO</i>	9
BOD	<i>BCL2-related ovarian death agonist</i>	18
BOK	<i>BCL2-related ovarian killer</i>	18
BRCA1 et 2	<i>Breast cancer protein 1 et 2</i>	A
BTC	<i>Bêta-celluline</i>	1
C-RAF (ou RAF1)	<i>de Rat fibrosarcoma C</i>	2
CA	<i>Carbohydrate antigen</i>	C
cADPR	<i>Cyclic ADP-ribose</i>	15
CAK	<i>Cell adhesion kinases</i>	1
CAK	<i>CDK-activating kinase</i>	17
CALC	<i>Calcitonine</i>	6
CALN (PPP3)	<i>Calcineurine</i>	15
CALR	<i>Calréticuline</i>	15
CAM	<i>Calmoduline</i>	15
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i>	11
cAMP	<i>Cyclic AMP</i>	6
CAPN	<i>Calpaïne</i>	15
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>	14
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>	18
CARMA1	<i>CARD and membrane-associated guanylate kinase</i>	13
CAS	<i>CRK associated substrate</i>	11
CASQ	<i>Calséquestrine</i>	15
CAT	<i>Catalase</i>	16
CBF	<i>Core-binding factor</i>	8
CBL	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>	1 13 C
CBP	<i>CREB-binding protein</i>	16
CCC	<i>Cytoplasmic cell-adhesion complex</i>	11
CCK	<i>Cholécystokinine</i>	6
CCL	<i>Chimiokine de type CC</i>	6
CCND1	<i>Cycline D1</i>	17
CCR	<i>Récepteur de chimiokine de type CC</i>	6
CD38	<i>ADP-ribosyl cyclase</i>	15
CDC25	<i>Cycle de division cellulaire 25</i> <i>(Cell division cycle 25)</i>	17
CDC42	<i>Cell division cycle 42</i>	11
CDH1	<i>E-cadhérine</i>	7

CDH2	N-cadhérine	11 7
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>	17
CDKN1A (p21 ^{CIP1})	<i>CDK inhibitor 1A</i>	17
CDKN1B (p27 ^{KIP1})	<i>CDK inhibitor 1B</i>	17
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	<i>CDK inhibitor 1C</i>	17
CDKN2A		
(p16 ^{INK4a})	<i>CDK inhibitor 2A</i>	17
CDKN2B		
(p15 ^{INK4b})	<i>CDK inhibitor 2B</i>	17
CDKN2C		
(p18 ^{INK4c})	<i>CDK inhibitor 2C</i>	17
CDKN2D		
(p19 ^{INK4d})	<i>CDK inhibitor 2D</i>	17
CDO	<i>Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes</i>	9
CER1	<i>Cerberus</i>	5
CFL	<i>Cofilin</i>	11
CFLAR (ou FLIP)	<i>Caspase 8 and FADD-like apoptosis regulator</i>	18
cGMP	<i>Cyclic GMP</i>	16
CHK ou CHEK	<i>Checkpoint kinase</i>	17
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>	2 C
CHRD	<i>Chordine</i>	5
CICR	<i>Ca²⁺-induced Ca²⁺ release</i>	6 15
CIP	<i>CDK inhibitor protein (voir CDKN1)</i>	17
CIS	<i>Cytokine-inducible SH2-domain-containing protein</i>	4
CK1	<i>Caséine kinase 1</i>	7 9
CKI	<i>Cycline kinase inhibitors</i>	17
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>	4
CNTFR	<i>Ciliary neurotrophic factor receptor</i>	4
CNV	<i>Copy number variations</i>	A
COX2	<i>Cyclooxygénase 2</i>	14 16
CRAC	<i>Calcium release-activated calcium modulator</i>	6 15
CRAC	<i>Calcium release-activated calcium modulator</i>	15 6
CRE	<i>cAMP response element</i>	6
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>	6 B
CRH	<i>ACTH1 releasing hormone</i>	6
CRIPTO	<i>Cripto</i>	5
CRK	<i>CT10 virus regulator of kinase</i>	11
CRMP2	<i>Collapsin response mediator protein 2</i>	10
CRP	<i>Collagen-related protein</i>	11
CS	<i>Cockayne syndrome</i>	A
CSF	<i>Colony-stimulating factor</i>	1 4
CSL	<i>CBF1/ Su(H)/Lag-1</i>	8

CSPG	<i>Chondroïtin sulfate proteoglycan</i>	10
CTL	<i>Chymotrypsin-like</i>	C
CTLA4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>	13
CTNNB	β -caténine	7
CTS	Cathepsine	C
CUB	<i>Complement protein, Urchin embryonic growth factor and Bone morphogenic protein 1</i>	10
CXCL	Chimiokine de type CXC	6
CXCR	Récepteur de chimiokine de type CXC	6
CYP	Cytochrome	14
CYTH	Cytohésine	11
DAG	Diacylglycérol	6
DAGK	Diacylglycérol kinase	15
DAP12	<i>DNAX-activation protein 12</i>	10
DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>	18
DAXX	<i>Death-domain associated protein</i>	18
DBD	<i>DNA binding domain</i>	14
DBF4	<i>Dumbbell former 4</i>	17
DCC	<i>Deleted in colon cancer</i>	18
DCLRE	<i>DNA cross-link repair (Artemis protein)</i>	A
DCN	Décorine	5
DcR	<i>Decoy receptor</i>	18
DD	<i>Death domain</i>	18
DDIT4	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	16
DDR	<i>Discoidin domain receptor</i>	1
DED	<i>Death effector domain</i>	18
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>	9
DIABLO	<i>Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>	18
DICER	<i>Double-stranded RNA-specific endoribonuclease</i>	B
DISC	<i>Death-inducing signalling complex</i>	18
DISP	<i>Dispatched</i>	9
DKC1	Diskérine	A
DKK	<i>Dickkopf homolog</i>	7
DLK	<i>Delta-like protein homolog</i>	8
DLK (MAP3K12)	<i>Dual leucine zipper kinase</i>	2
DLL	<i>Delta-like ligands</i>	8
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>	A
DNMT1	<i>DNA methyltransferase</i>	B
DOCK	<i>Dedicator of cytokinesis</i>	
DOS	<i>Delta and OSM-11-like proteins</i>	8
DR	<i>Death receptor</i>	18
DSL	<i>Delta, Serrate, Lag2</i>	8
DUSP	<i>Dual specificity phosphatase</i>	2

DVL	<i>Dishevelled</i>	7
E1	<i>Ubiquitin activating enzyme</i>	C
E2	<i>Ubiquitin conjugating enzyme</i>	C
E3	<i>Ubiquitin protein ligase</i>	C
ECL (CCL21)	<i>Efficient chemoattractant for lymphocytes</i>	6
ECM	<i>Extracellular matrix</i>	11
EDA	<i>Ectodysplasin</i>	18
EDAR	<i>EDA receptor</i>	18
EDARADD	<i>EDAR associated death domain protein</i>	18
EDEM1	<i>ER degradation-enhancing α-mannosidase-like protein 1</i>	C
EDN	<i>Endothéline</i>	6
EEF2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>	3 C
EFN	<i>Ephrin</i>	1
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	1
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	1
EIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>	3 C
EIF4EBP1	<i>EIF4E binding protein 1</i>	3 C
ELK	<i>ETS-like kinase</i>	2
ENG	<i>Endogline</i>	5
eNOS	<i>Endothelial NOS</i>	16
EPAC	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>	6
EPGN	<i>Épigène</i>	1
EPH	<i>Ephrin receptor</i>	1
EPO	<i>Erythropoietin</i>	4
EPOR	<i>Erythropoietin receptor</i>	4
ER α , ER β		
(ESR1, ESR2)	<i>Estrogen receptor α, Estrogen receptor β</i>	14
ERBB	<i>de Erythroblastosis B virus</i>	1
ERCC	<i>Excision repair cross complementation group</i>	A
ERE	<i>Estrogen responsive element</i>	14
EREG	<i>Épiréguline</i>	1
ERF	<i>ETS repressor factor</i>	2
ERK		
(MAPK)	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>	2
ERN1	<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>	C
ERR	<i>Estrogen-related receptor</i>	14
ERS	<i>Endoplasmic reticulum stress</i>	C
ETS	<i>de E twenty-six oncogene homolog</i>	2
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog</i>	B
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i>	18
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>	11
FARP	<i>FERM, RhoGEF and pleckstrin domain protein</i>	10
FAS	<i>Fragment for apoptosis stimulation</i>	18

FASL ou FASLG	<i>FAS ligand</i>	18
FAT	<i>Focal adhesion targeting</i>	11
FEN	<i>Flap endonuclease</i>	A
FER	<i>FES-related tyrosine kinase</i>	10
FERM	<i>Four-point-one, ezrin, radixin and moesin</i>	4 10 11
FERMT	<i>Fermitin family homolog (kindline)</i>	11
FES	<i>de Feline Sarcoma virus</i>	10
FGF	<i>Fibroblastic growth factor</i>	1
FGFR	<i>Fibroblastic growth factor receptor</i>	1
FHF	<i>FGF homologous factors</i>	1
FIH	<i>Factor inhibiting HIF</i>	16
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12</i>	3
FLIP (ou CFLAR)	<i>FADD-like inhibitory protein</i>	18
FLK	<i>Fetal liver kinase</i>	1
FLN	<i>Filamine</i>	11
FLT	<i>FMS-like tyrosine kinase</i>	1
FMS	<i>de Feline McDonough sarcoma virus</i>	1
FN	<i>Fibronectine</i>	16
FOS	<i>de Finkel, Biskis and Jinkins osteosarcoma virus</i>	2
FOXO	<i>Forkhead box class O</i>	3 16
FRAT	<i>Frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma</i>	7
FRH	<i>FSH-releasing hormone</i>	6
FRS	<i>FGF receptor substrate</i>	1
FSH	<i>Folliculin stimulating hormone</i>	6
FST	<i>Follistatine</i>	5
FURIN	<i>Furine</i>	8
FYN	<i>FGR-YES related new gene</i>	13 10
FZD	<i>Frizzled (mot anglais signifiant « frisotté »)</i>	7
G-CSF (CSF3)	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>	4
G-CSFR (CSF3R)	<i>Granulocyte colony stimulating factor receptor</i>	4
G-SH	<i>Glutathion réduit</i>	16
G-SS-G	<i>Glutathion oxydé</i>	16
GAB	<i>GRB2-associated binding protein</i>	13
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>	6 15
GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage inducible transcript</i>	14 17
GAG	<i>Glycosaminoglycane</i>	C
GAL	<i>Galanine</i>	6
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>	2 3 6 10
GAS6	<i>Growth arrest-specific gene 6</i>	1
GCG	<i>Glucagon</i>	6
GDF	<i>Growth differentiation factors</i>	5
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>	1

GDP	Guanosine diphosphate	2
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>	2 3 6 10
GFL	<i>GDNF family ligand</i>	1
GFRa	<i>GDNF family receptors alpha</i>	1
GG-NER	<i>Global genome NER</i>	A
GH	<i>Growth hormone</i>	4
GHR	<i>Growth hormone receptor</i>	4
GIST	<i>Gastro-intestinal stromal tumor</i>	1
GLI	<i>Glioblastoma associated oncogene</i>	9
GM-CSF (CSF2)	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>	4
GM-CSFR (CSF2R)	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor</i>	4
GNT5	β 1,6-N-acétylglucosaminyl-transférase	C
gp130 (IL6ST)	<i>IL6 signal transducer</i>	4
GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>	6
GPI	<i>Glycosyl-phosphatidylinositol</i>	C 11
GPX	<i>Glutathion peroxydase</i>	16
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>	14
GRB2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>	1 2
GRE	<i>Glucocorticoid responsive element</i>	14
GREM1	<i>Gremlin</i>	5
GRK	<i>GPCR kinase</i>	6
GRP	<i>Gastrin-releasing peptide</i> (bombésine)	6
GRP78, GRP94	<i>Glucose-regulated protein, 78 kDa, 94 kDa</i>	C
GSK3b	<i>Glycogene synthase kinase β</i>	7 3 9 11 15
GSR	<i>Glutathion réductase</i>	16
GTP	Guanosine triphosphate	2
GTPase	Guanosine triphosphatase	2
GUCY	Guanylyl cyclase	16
H (suivi d'un numéro)	Histone	B
HAV	histidine-alanine-valine	11
H-RAS	<i>Harvey RAS</i>	2
HBEGF	<i>Heparin-binding EGF</i>	1
HD	<i>Heterodimerisation domain</i>	8
HDAC	Histone désacétylase	B
HDI	<i>Histone deacetylase inhibitor</i>	B
HECT	<i>Homologous to E6-associated protein C terminus</i>	C
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>	1
HGFL	<i>Hepatocyte growth factor like (MST1)</i>	1
HH	<i>de Hedgehog</i> (en anglais : hérisson)	9
HHAT	<i>Hedgehog acyltransferase</i>	9
HHIP	<i>Hedgehog interacting protein</i>	9
HIF1 α	<i>Hypoxia-induced factor 1α</i>	16 C

HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>	C
HLH	<i>Helix-loop-helix</i>	B
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>	12
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>	B
HOP	<i>HSP organizing protein</i>	C
HOX	<i>Homeobox</i>	9
HRE	<i>Hormone responsive element</i>	14
HRE	<i>Hypoxia responsive element</i>	16
HRK	<i>Harakiri BCL2-interacting protein</i>	18
HSE	<i>Heat shock response elements</i>	C
HSF	<i>Heat shock factors</i>	C
HSP	<i>Heat shock proteins</i>	C
HSPG	<i>Chondroitin sulfate proteoglycan</i>	10
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>	A
hTR	<i>Human Telomerase RNA</i>	A
HTRA2	<i>High temperature requirement protein A2</i>	18
HTT	<i>Huntingtine</i>	C
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>	18
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>	11
ICOS	<i>Inducible T-cell costimulator</i>	13
IFN	<i>Interféron</i>	4 12
IgCAM	<i>Immunoglobulin-like cell adhesion molecule</i>	11
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i>	1
IGF1R et IGF2R	<i>IGF receptors</i>	1
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>	9
I κ B (IKB)	<i>Inhibitor of NFκB</i>	12
IKK (IKBK)	<i>IκB kinase ou Inhibitor of NFκB kinase</i>	12
IL	<i>Interleukine</i>	4 12
IL1R	<i>IL1 receptor</i>	12
IL1RA	<i>IL1 receptor antagonist</i>	12
IL6ST (gp130)	<i>IL6 signal transducer</i>	4
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>	11
ILKAP	<i>ILK-associated protein phosphatase</i>	11
ILR	<i>Interleukin receptor</i>	4
ILRAP	<i>IL1 receptor accessory protein</i>	12
IMD	<i>Integrin-mediated death</i>	11
INHA ou INH α	<i>Inhibine</i>	5
INHB ou INH β	<i>Activine</i>	5
INK	<i>Inhibitor of cyclin-dependent kinase (voir CDKN2)</i>	17
iNOS	<i>Inducible NOS</i>	16
INR	<i>Transcription initiator</i>	2
INS	<i>Insuline</i>	1
INSR	<i>Insulin receptor</i>	1
IP3	<i>Inositol-1,4,5-triphosphate</i>	6

IP3R ou ITPR	<i>IP3 receptor</i>	6
IPP	<i>Integrin, PINCH and parvin</i>	11
IRAK	<i>IL1 receptor-associated kinase</i>	12
IRE	<i>Inositol-requiring kinase</i>	C
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>	C
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>	12
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>	1
ITAF	<i>Internal initiation trans-acting factor</i>	C
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>	13
ITGA	Intégrine α	11
ITGB	Intégrine β	11
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase	1
ITK	<i>IL2-induced tyrosine kinase</i>	13
JAB	<i>JAK binding protein</i>	4
JAG	de Jagged (mot anglais signifiant « dentelé »)	8
JAK	<i>Just another kinase</i> ou <i>Janus kinase</i>	4
JH	<i>JAK homology domain</i>	4
JNK (SAPK, MAPK8)	<i>JUN N-terminal kinase</i>	2
JUN	de Junana, nom du nombre 17 en japonais	2
K-RAS	<i>Kirsten RAS</i>	2
KAC	Jeu de mot sur l'inversion de CAK	17
KDR (VEGFR2)	<i>Kinase insert domain protein receptor</i>	1
KIF	<i>Kinesin family member</i>	9
KIP	<i>Kinase inhibitor protein</i> (voir CDKN1)	17
KIR	<i>Kinase-inhibitory region</i>	4
KIT	du nom d'un oncogène viral	1
KITLG	<i>KIT ligand</i>	1
KRT	Kératine	16
KSR	<i>Kinase suppressor of RAS 1</i>	2
LAT	<i>Linker for the activation of T cells</i>	13
LBD	<i>Ligand binding domain</i>	14
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>	13
LCP2	<i>Lymphocyte cytosolic protein 2</i>	13
LEFTY	<i>Left-right determination factor</i>	5
LEP ou OBS	<i>Leptin</i>	4
LEPR ou OBR	<i>Leptin receptor</i>	4
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> (intégrine $\alpha_L\beta_2$)	11
LGIC	<i>Ligand-gated ion channels</i>	15
LH	<i>Luteinizing hormone</i>	6
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>	4
LIFR	<i>Leukemia inhibitory factor receptor</i>	4
LIG	Ligase	A

LIM	<i>LIN-11, ISL-1 and MEC-3</i>	10 11
LIMK1	<i>LIM domain kinase 1</i>	10
LIMS	<i>LIM and senescent cell antigen-like domains protein</i>	11
LINE	<i>Long interspersed elements</i>	A
LKB1		3
LMR	<i>de Lemur</i>	1
LNR	<i>Lin12 and Notch repeats</i>	8
LPA	<i>Lysophosphatidic acid</i> (Acide lysophosphatidique)	6
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>	12
LRH	<i>LH-releasing hormone</i>	6
LRP	<i>LDL receptor related protein</i>	7
LTK	<i>Leukocyte receptor tyrosine kinase</i>	1
LXR	<i>Liver X receptor</i>	14
LYN	<i>Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog</i>	13
LZK (MAP3K13)	<i>Leucine zipper-bearing kinase</i>	2
M-CSF (CSF1)	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>	1
M-CSFR (CSF1R)	<i>Macrophage colony stimulating factor receptor</i>	1
MAC1	<i>de Macrophage (intégrine $\alpha_M\beta_2$)</i>	11
MAD	<i>MAX dimerisation protein</i>	2
MAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog</i>	5
MAF	<i>de l'oncogène viral Musculo-aponeurotic fibrosarcoma</i>	2
MAL	<i>MyD88 adaptor-like</i>	12
MALT1	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>	13
MAM	<i>Meprin, A5 protein, μ protein tyrosine phosphatase</i>	10
MAML	<i>Mastermind-like protein</i>	8
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>	2
MAP2K (ou		
MAPKK)	<i>MAP kinase kinase</i>	2
MAP3K (ou		
MAPKKK)	<i>MAP kinase kinase kinase</i>	2
MAPK	<i>MAP kinase</i>	2
MAT1	<i>Ménage à trois 1</i>	17
MAX	<i>Myc-associated factor X</i>	2
MBD	<i>Methyl CpG-binding domain protein</i>	B
MCAM	<i>Melanoma-associated cell adhesion molecule</i>	11
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1</i>	18
MDK	<i>Midkine</i>	1
MDM2	<i>Murine double-minute p53 binding protein</i>	17
MDR1		
(ABCB1)	<i>Multidrug resistance 1 (P-glycoprotein)</i>	14
MED8	<i>Mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 8</i>	8

MEK (MAP2K)	<i>MAPK-ERK kinase</i>	2
MEKK (MAP3K)	<i>MAPK-ERK kinase kinase</i>	2
MERTK	<i>Monocytes, epithelial and reproductive tissues tyrosine kinase</i>	1
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition factor receptor tyrosine kinase</i>	1
MGA	<i>MAX gene associated</i>	2
MGMT	<i>Méthylguanine méthyltransférase</i>	A
MH	<i>MAD homology domain</i>	5
MIDAS	<i>Metal ion dependent adhesion site</i>	11
MIR	<i>Micro RNA</i>	B
MIS	<i>Mullerian inhibitory substance</i>	5
MK	<i>MAPK-activated protein kinase</i>	2
MKNK (MNK)	<i>MAP kinase interacting kinase</i>	2
MKP	<i>MAP kinase phosphatase</i>	2
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>	11
MLH	<i>MutL homolog 1</i>	A
MLK1 (MAP3K9)	<i>Mixed lineage kinase 1</i>	2
MMP	<i>Métalloprotéinase</i>	C
MMR	<i>Mismatch repair</i>	A
MNK (MKNK)	<i>MAPK interacting kinase</i>	2
MNT	<i>MAX interacting protein</i>	2
MO25	<i>Mouse protein 25</i>	3
MORG1	<i>MAPK organizer 1</i>	2
MOS	<i>de Moloney sarcoma virus homolog</i>	2
MPF	<i>Mitosis promoting factor</i>	17
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i>	14
MRE	<i>Meiotic recombination homolog</i>	A
MSH	<i>MutS homolog 2</i>	A
MSK	<i>Mitogen and stress-activated kinase</i>	2
MST1	<i>Macrophage stimulating 1</i>	1
MST1R	<i>Macrophage stimulating 1 receptor</i>	1
MSTN	<i>Myostatin</i>	5
MTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	3
MUC1	<i>Mucine 1</i>	C
MUSK	<i>Muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase</i>	1
MXD	<i>MAX dimerisation protein</i>	2
MYB	<i>de Myeloblastosis virus</i>	2
MYC	<i>de Myelocytomatosis virus</i>	2
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>	12
MYH	<i>Myosine</i>	11
MYT	<i>Myelin transcription factor</i>	17
N-RAS	<i>Neuroblastoma RAS</i>	2
NAADP	<i>Nicotinic acid dinucleotide phosphate</i>	15

NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>	A
NCAM	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>	11
NCK	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase</i>	11
NCOA	<i>Nuclear receptor coactivator</i>	14
NCOR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>	14
NCSTN	<i>Nicastrine</i>	8
NCX	<i>Sodium/calcium exchanger</i>	15
NECD	<i>Notch extracellular domain</i>	8
NEMO (IKK γ ou IKBKG)	<i>NFκB essential modulator</i>	12
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>	A
NET		2
NEXT	<i>Notch extracellular truncation</i>	8
NF	<i>Neurofibromatosis</i>	2
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>	15
NF κ B (NFKB)	<i>Nuclear factor kappa B</i>	12 15 18
NGF	<i>Nerve growth factor</i>	1 18
NGFR	<i>Nerve growth factor receptor</i>	18
NHD	<i>NFAT homology domain</i>	15
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	A
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>	8
NIK	<i>NFκB-inducing kinase</i>	12 13 18
NLR	<i>NOD-like receptors</i>	12
NLS	<i>Nuclear localisation sequence</i>	C
NMB	<i>Neuroméline B</i>	6
nNOS	<i>Neuronal NOS</i>	16
NO	<i>Nitric oxide (Oxyde nitrique)</i>	16
NOD	<i>Nucleotide binding and oligomerization domain</i>	12
NODAL	<i>Nodal</i>	5
NOG	<i>Noggin</i>	5
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>	16
NOTCH	<i>Mot anglais signifiant « dentelé »</i>	8
NOX	<i>NADPH oxydases</i>	16
NOXA	<i>d'un mot latin signifiant « nuisance »</i>	18
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>	C
NRAGE	<i>Neurotrophin receptor melanoma antigen homolog</i>	18
NRG	<i>Neurégulines</i>	1
NRP	<i>Neuropilines</i>	10
NRR	<i>Negative regulatory region</i>	8
NT	<i>Neurotrophine</i>	1
NTMIC	<i>Notch transmembrane and intracellular domain</i>	8
NTRK	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor</i>	1
NTS	<i>Neurotensine</i>	6

OBR (LEPR)	<i>Leptin receptor</i>	4
OBS (LEP)	<i>Leptin</i>	4
ODDD	<i>Oxygen-dependent degradation domain</i>	16
ORC	<i>Origin recognition complex 6</i>	17
OSM	<i>Oncostatin M</i>	4
OSMR	<i>Oncostatin M receptor</i>	4
OXT	<i>Oxytocine</i>	6
p110 (PIK3CA)	Phosphatidylinositol 3-kinase, sous-unité catalytique A	3
p14 ^{ARF}	Alternate reading frame, 14 kDa	17
p15 ^{INK4b}		
(CDKN2B)	Inhibiteur de kinase de 15 kDa	17
p16 ^{INK4a}		
(CDKN2A)	Inhibiteur de kinase de 16 kDa	17
p18 ^{INK4c}		
(CDKN2C)	Inhibiteur de kinase de 18 kDa	17
p19 ^{INK4d}		
(CDKN2D)	Inhibiteur de kinase de 19 kDa	17
p21 ^{CIP1/KIP1}		
(CDKN1A)	Inhibiteur de kinase de 21 kDa	17
p27 ^{KIP1}		
(CDKN1B)	Inhibiteur de kinase de 27 kDa	17
P2X	Récepteurs purinergiques ionotropes	15
P2Y	Récepteurs purinergiques métabotropes	15
p38 (MAPK)	Protéine de la voie des MAP kinases	2
p53	Protéine p53	17 18
p57 ^{KIP2} (CDKN1C)	Inhibiteur de kinase de 57 kDa	17
p85 (PIK3R1)	Phosphatidylinositol 3-kinase, sous-unité régulatrice 1	3
PACE	<i>Paired basic amino acid cleaving enzyme</i>	5 C
PAK	<i>p21-activated kinase</i>	2 6 10 11
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>	12
PAR	<i>Protease-activated receptors</i>	6
PARP	Poly(ADP) ribose polymérase	A
PARV	Parvine	11
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	A
PCP	<i>Planar cell polarity</i>	7
PCSK	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin</i>	5 C
PD1	<i>Programmed death 1</i>	13
PDE	Phosphodiesterase	6 15
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	1
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>	1
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>	C
PKD1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>	3

PDZ	<i>Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occludens-1</i>	10
PECAM	<i>Platelet and endothelial cell adhesion molecule</i>	11
PERK	<i>PRKR-like ER kinase</i>	C
PEST	<i>Proline-glutamic acid-serine-threonine rich domains</i>	8 C
PGC1	<i>PPAR gamma coactivator 1</i>	16
PGPH	<i>Post-glutamate peptide hydrolase</i>	C
PH	<i>Pleckstrin-homology domain</i>	3 11
PHD	<i>Prolyl hydroxylase</i>	16
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>	3
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>	3
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>	4
PICK	<i>Proteins interacting with C-kinase</i>	6
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, sous-unité catalytique A (p110)</i>	3
PIK3R1	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase, sous-unité régulatrice 1 (p85)</i>	3
PIKK	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase</i>	A
PINCH	<i>Particularly interesting new Cys-His-rich protein</i>	11
PIP	<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate</i>	3
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate</i>	3
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>	3
PKA	<i>Protéine kinase A</i>	6 9 15
PKB (ou AKT)	<i>Protéine kinase B</i>	3
PKC	<i>Protéine kinase C</i>	6
PKG ou PRKG	<i>cGMP-dependent protein kinase</i>	16
PLAD	<i>Pre-ligand assembly domain</i>	18
PLAT	<i>Activateur du plasminogène</i>	C
PLC β ou PLCB	<i>Phospholipase C bêta</i>	6 2 15
PLC γ ou PLCG	<i>Phospholipase C gamma</i>	1 2 6
PLG	<i>Plasminogène</i>	C
PlGF ou PGF	<i>Placental growth factor</i>	1
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>	17
PLXN	<i>Plexine</i>	10
PMCA	<i>Plasma membrane calcium ATPase</i>	15
PMS	<i>Postmeiotic segregation increased</i>	A
POL suivi d'une lettre	<i>ADN polymérase</i>	A
POLR suivi d'un numéro	<i>ARN polymérase</i>	B
POT	<i>Protection of telomeres</i>	A
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>	14
PPRE	<i>Peroxisome-proliferator responsive element</i>	14
PR (PGR)	<i>Progesterone receptor</i>	14

PRE	<i>Polycomb response elements</i>	B
PRKR		C
PRL	<i>Prolactine</i>	4
PRLR	<i>Prolactin receptor</i>	4
PRMT	<i>Protéine-arginine N-méthyl transférase</i>	C
PROS1	<i>Protein S</i>	1
PRR	<i>Pattern-recognition receptors</i>	12
PRX ou PRDX	<i>Peroxyrédoxine</i>	16
PSEN	<i>Préséniline</i>	8
PSI	<i>Plexins, semaphorins, and integrins</i>	11
PSM suivi d'une lettre	<i>Protéines du protéasome</i>	C
PTB	<i>Phosphotyrosine binding domain</i>	1
PTCH	<i>Patched</i>	9
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	3
PTH	<i>Parathormone</i>	6
PTK	<i>Protein tyrosine kinase</i>	1 11
PTN	<i>Pléiotrophine</i>	1
PTPN	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor</i>	4 6
PTPR (CD45)	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type</i>	13
PUMA	<i>p53-upregulated mediator of apoptosis</i>	18
PVALB	<i>Parvalbumine</i>	15
PXN	<i>Paxilline</i>	11
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>	14
PYK	<i>Proline-rich tyrosine kinase</i>	11
RAC	<i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate</i>	10 11 B
RACK	<i>Receptors for activated C-kinase</i>	6
RAD	<i>Radiation response yeast homolog</i>	A
RAF	<i>de Rat fibrosarcoma virus</i>	2
RAL	<i>RAS related</i>	2
RALGDS	<i>RAL guanine nucleotide dissociation stimulator</i>	2
RAM	<i>RBPJK-association module</i>	8
RAN	<i>RAS-related nuclear protein</i>	C
RANTES (CCL5)	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>	6 12
RAP	<i>Regulator of adhesion and polarization</i>	6 13
RAPL	<i>RAP enriched in lymphocytes</i>	
RAPTOR	<i>Regulatory associated protein of TOR</i>	3
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>	14
RARE	<i>Retinoic acid responsive elements</i>	14
RAS	<i>de Rat sarcoma virus</i>	2
RASA1	<i>RAS activator 1</i>	2
RASGAP	<i>RAS GTPase-activating protein</i>	2
RASGRP	<i>RAS guanyl releasing protein</i>	2 6

RB	<i>Retinoblastoma protein</i>	17
RBL	<i>Retinoblastoma-like protein</i>	17
RBPJK	<i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>	8
RE	Réticulum endoplasmique	C
REDD1/RTP801	<i>Regulated in development and DNA damage responses</i>	16
REL	<i>Reticulo-endotheliosis viral oncogene homolog</i>	12
RET	<i>Rearranged during transfection</i>	1
RFC	<i>Replication factor C</i>	A
RGD	arginine-glycine-acide aspartique	11
RGM	<i>Repulsive guidance molecule</i>	5
RGS	<i>Regulator of G protein signaling</i>	6
RHD	<i>REL homology domain</i>	12
RHEB	<i>RAS homolog enriched in brain</i>	3
RHO	<i>RAS homolog</i>	10 6 11 C
RHOGAP		
(ARHGAP)	<i>RHO GTPase activating protein</i>	10 11
RHOGEF (RGNEF)	<i>RHO guanine nucleotide exchange factor</i>	10 11
RIAM	<i>RAP1-interacting adaptor molecule</i>	13
RICTOR	<i>Rapamycin insensitive companion of TOR</i>	3
RING	<i>Really interesting new gene</i>	18
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>	17 C
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>	B
RND		10
ROC	<i>Receptor-operated channels</i>	15
ROCK	<i>RHO-associated kinase</i>	6 11
RON	Récepteur d'origine nantaise (MST1R)	1
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>	14
ROR	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor</i>	1
ROS	de l'oncogène <i>c-ros</i>	1
ROS	<i>Reactive oxygene species</i>	16
RPA	<i>Replication protein A</i>	A
RPS6KA (RSK)	<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>	3
RSK (RPS6KA)	<i>Ribosomal S6 kinase</i>	3
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase	1
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>	14
RXRE	<i>Retinoic X responsive elements</i>	14
RYK	<i>Receptor-like tyrosine kinase</i>	1
RYR	<i>Ryanodine receptors</i>	15
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>	6 15
SAE	<i>SUMO-activating enzyme</i>	C
SAP	<i>SRF accessory protein</i>	2
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>	2

SARA	<i>SMAD anchor for receptor activation</i>	5
SCF	<i>Stem cell factor (KITLG)</i>	1
SCF	<i>SKP1/Cullin/F-box</i>	12 C
SCFR	<i>Stem cell factor receptor (KIT)</i>	1
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>	4
SCT	<i>Sécrétine</i>	6
SDF1 (CXCL12)	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>	6
SEF		2
SEMA	<i>Sémaphorine</i>	10
SENP	<i>Sentrin-specific protease</i>	C
SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>	15
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulators</i>	14
SF	<i>Scatter factor</i>	1
SFK	<i>SRC family kinase</i>	11 13
SFRP	<i>Secreted frizzled-related proteins</i>	7
SFRS1	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 1</i>	B
SH2	<i>SRC homology domain 2</i>	1 2 4 11
SH3	<i>SRC homology domain 3</i>	2 11
SHC	<i>SH2 domain-containing</i>	1 11
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>	9
SHP	<i>SH2 domain-containing phosphatase</i>	1 4 13
SIN3	<i>Silencing homolog 3</i>	2
SINE	<i>Short interspersed elements</i>	A
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	B
SKAP55	<i>SRC kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa</i>	13
SKI	<i>Skinny Hedgehog</i>	9
SKP	<i>S-phase kinase-associated protein</i>	17
SLP76	<i>SH2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa</i>	13
SLUG	<i>en anglais : limace</i>	5
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>	18
SMAD	<i>Small (C. elegans) et mad (Mothers against decapentaplegic homolog)</i>	5
SMO	<i>Smoothened</i>	9
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoic and thyroid receptor</i>	14
SMURF	<i>SMAD ubiquitination regulating factor</i>	5
SNAIL	<i>en anglais : escargot</i>	5
SNC	<i>Synuéline</i>	C
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>	A
SOC	<i>Store-operated channels</i>	15
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>	4
SOD	<i>Superoxyde dismutase</i>	16
SOS1	<i>Son of sevenless homolog 1</i>	2
SOST	<i>Sclérostine</i>	5

SP1	<i>Specifity protein 1</i>	2
SRC	<i>de Sarcoma virus</i>	1 2 4 13
SRE	<i>Serum response element</i>	2
SRF	<i>Serum response factor</i>	2 B
SRP	<i>Signal recognition particle</i>	C
SRR	<i>Serine-rich region</i>	15
SSI	<i>STAT-induced STAT inhibitor</i>	4
SST	<i>Somatostatine</i>	1 6
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	4
STICK	<i>Substrates that interact with C-kinase</i>	6
STR	<i>Short Tandem Repeats</i>	A
STRAD	<i>STE20-related adaptor</i>	3
SUFU	<i>Suppressor of fused</i>	9
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>	C
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>	13
SYT	<i>Synaptotagmine</i>	15
TAB	<i>TGFβ-activated kinase 1</i>	12
TACE	<i>TNF-α converting enzyme</i>	1 8 C
TAD	<i>Transactivation domain</i>	16
TAK1 (MAP3K7)	<i>TGFβ activated kinase 1</i>	5 12
TAM	<i>Tyro 3, Axl and Merck</i>	1
TANK	<i>TRAF-associated NFκB activator</i>	12
TAOK (MAP3K)	<i>Thousand-and-one amino acid protein kinase</i>	2
TBK	<i>TANK binding kinase</i>	12
T β R ou TGFBR	<i>TGFβ receptor</i>	5
TC-NER	<i>Transcription-coupled NER</i>	A
TCF/LEF	<i>T-cell factor/lymphoid enhancer factor</i>	7
TCR	<i>T-cell receptor</i>	13
TEK	<i>Tyrosine kinase, endothelial</i>	1
TF	<i>Transcription factor</i>	B
TGF α ou TGFA	<i>Transforming growth factor alpha</i>	1
TGF β ou TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>	5
TGFBR ou T β R	<i>Transforming growth factor beta receptor</i>	5
THB	<i>Thrombospondine</i>	10 18
TIAM	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis</i>	11
TIE	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains</i>	1
TIM	<i>Translocase of the inner membrane</i>	C
TIM	<i>TRAF-interacting motif</i>	10 18
TIN	<i>TRF1-interacting protein</i>	A
TIR	<i>Toll-interleukin receptor domain</i>	12
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein</i>	12
TL	<i>Trypsin-like</i>	C
TLN	<i>Taline</i>	6 11

TLR	<i>Toll-like receptor</i>	12
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	18
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>	18
TNFRSF	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>	18
TNFSF	<i>Tumor necrosis factor superfamily</i>	18
TNKS	<i>Tankyrase</i>	A
TNNC	<i>Troponine C</i>	15
TNS	<i>Tensine</i>	11
TOM	<i>Translocase of the outer membrane</i>	C
TOP	<i>Topoisomérase</i>	A
TORC	<i>Target of rapamycin complex</i>	3
TP53	<i>Tumor protein 53</i>	17 18
TPL2 (MAP3K8)	<i>Tumor progression locus-2</i>	2
TPO	<i>Thrombopoïétine</i>	4
TPOR	<i>Thrombopoietin receptor</i>	4
TPP	<i>TIN2 and POT1-organizing protein</i>	A
TR (THR)	<i>Thyroid hormone receptor</i>	14
TRADD	<i>TNF-receptor associated death domain protein</i>	18
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>	12 18
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>	18
TRAILR	<i>TRAIL receptor</i>	18
TRAM	<i>TRIF related adaptor molecule</i>	12
TRB (gène F2)	<i>Thrombine</i>	6
TRBP	<i>Transactivation-responsive RNA-binding protein</i>	B
TRCP	<i>Transducing repeat containing protein</i>	7 12
TRE	<i>Thyroid hormone responsive element</i>	14
TREM	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i>	10
TRF	<i>Telomere repeat binding factor</i>	A
TRH	<i>TSH-releasing hormone</i>	6
TRIF	<i>TIR domain containing adaptor inducing interferon β</i>	12
TRK	<i>Tropomyosin receptor kinase</i>	1
TRP	<i>Trypsine</i>	6 C
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>	3
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i>	6
TWIST	<i>en anglais : torsade</i>	5
TXN	<i>Thiorédoxine</i>	16
TXNRD	<i>Thiorédoxine réductase</i>	16
TYK	<i>Tyrosine kinase</i>	4
TYRO3	<i>Tyrosine kinase 3</i>	1
UB suivi d'une lettre	<i>Ubiquitine</i>	C
UGT	<i>UDP-glucose glucuronosyltransférase</i>	14

UNC5	<i>Uncoordinated</i> (d'après le gène homologue de <i>Caenorhabditis elegans</i>)	18
UPR	<i>Unfolded protein response</i>	C
UTR	<i>Untranslated region</i>	C
VAV	de la 6 ^e lettre de l'alphabet hébreu (6 ^e oncogène découvert dans le laboratoire de Barbacid)	13 11
VBC	<i>VHL-elongin B-elongin C</i>	16
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>	11
VCL	Vinculine	11 6
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>	18
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>	14
VDRE	<i>Vitamin D responsive element</i>	14
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	1
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>	1
VHL	de <i>Von Hippel Lindau disease</i>	16 C
VIM	Vimentine	16
VOC	<i>Voltage-operated channels</i>	15
VPR	Vasopressine	6
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>	11 13
WEE	d'un mot écossais signifiant « petite »	17
WIF	<i>WNT inhibitory factor</i>	7
WNT	<i>Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site</i>	7
XBP1	<i>X-box-binding protein 1</i>	C
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>	A
XPO5	Exportine 5	B
XRCC	<i>X-ray repair cross complementation group</i>	A
ZAK	<i>Leucine zipper- and sterile alpha motif-containing kinase</i>	2
ZAP70	<i>Zeta-chain associated protein kinase</i>	13
ZU5	<i>Zona occludens homolog 5</i>	18